



Faculdade de Medicina de Botucatu



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
- UNESP -

**Avaliação dos marcadores TGF- β 1 e TGF- β RII em carcinomas
mamários localmente avançados e sua associação com fatores
clínico-patológicos**

Carlos Eduardo Paiva

**Orientadora: Prof Dra Mariângela Esther
Alencar Marques**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de
Medicina de Botucatu da Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Botucatu-SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Paiva, Carlos Eduardo.

Avaliação dos marcadores TGF- β 1 e TGF- β R2 em carcinomas mamários localmente avançados e sua associação com fatores clínico-patológicos / Carlos Eduardo Paiva. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Mariângela Esther de Alencar Marques

Capes: 40105008

1. Mamas – Câncer – Aspectos genéticos. 2. Imunohistoquímica.

Palavras-chave: Análise de sobrevivência; Fator transformador de crescimento beta1; Imunohistoquímica; Receptor 2 do fator transformador de crescimento beta; Neoplasias mamárias.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

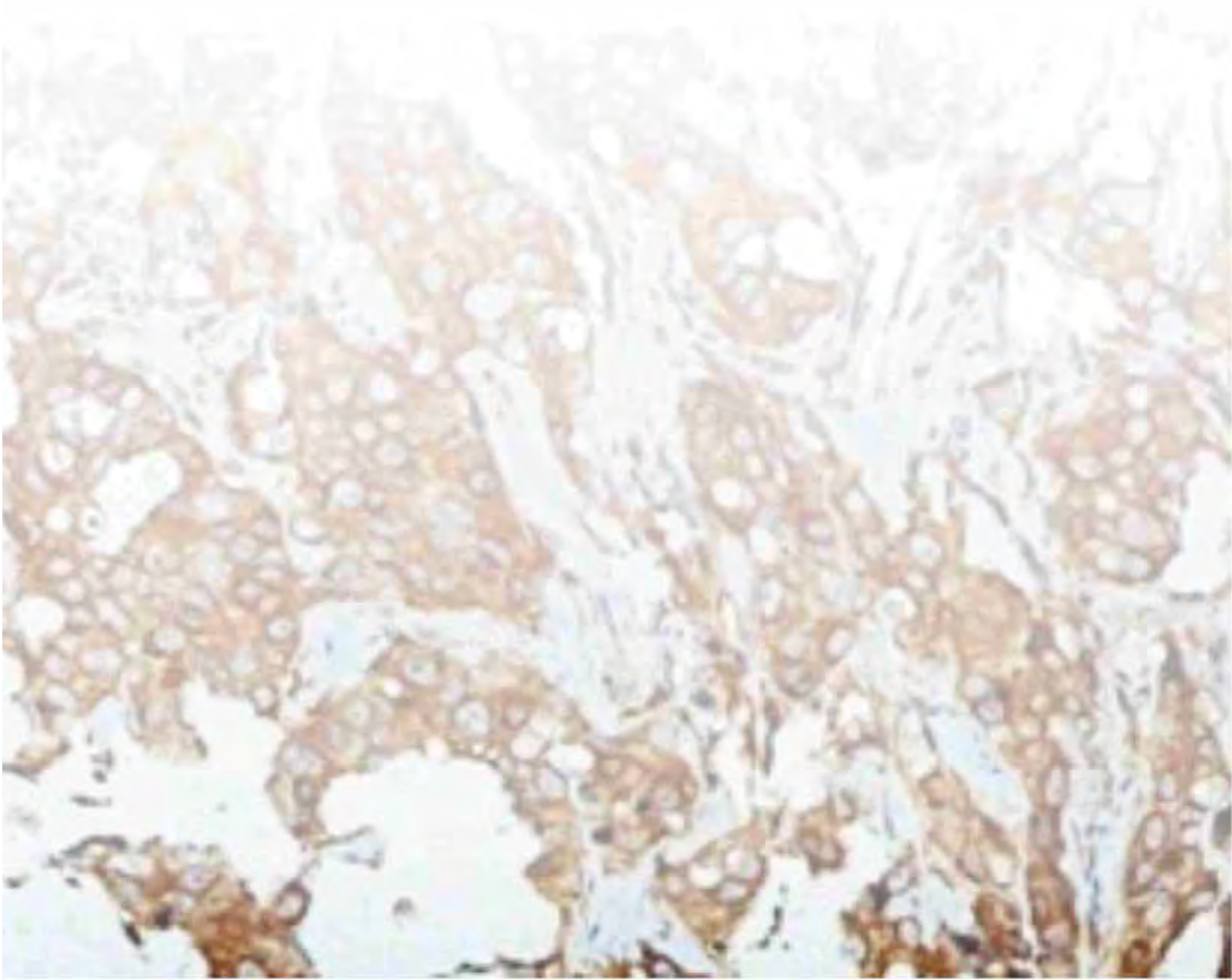


Evolução da Medicina – Calmon Barreto (1909-1994)

Óleo sobre Tela, exposto no saguão de entrada do Hospital Dom Bosco (Araxá-MG)

Apesar dos avanços da medicina serem mais evidentes nos últimos cem anos, ela vem se desenvolvendo há milhares de anos. Alguns cientistas iluminados ganharam notoriedade no meio acadêmico em função de grandes descobertas. Para tanto, utilizaram conhecimentos de autores precedentes. Desta forma, todo conhecimento científico produzido de forma criteriosa é válido, mesmo estudos pouco ambiciosos como este.

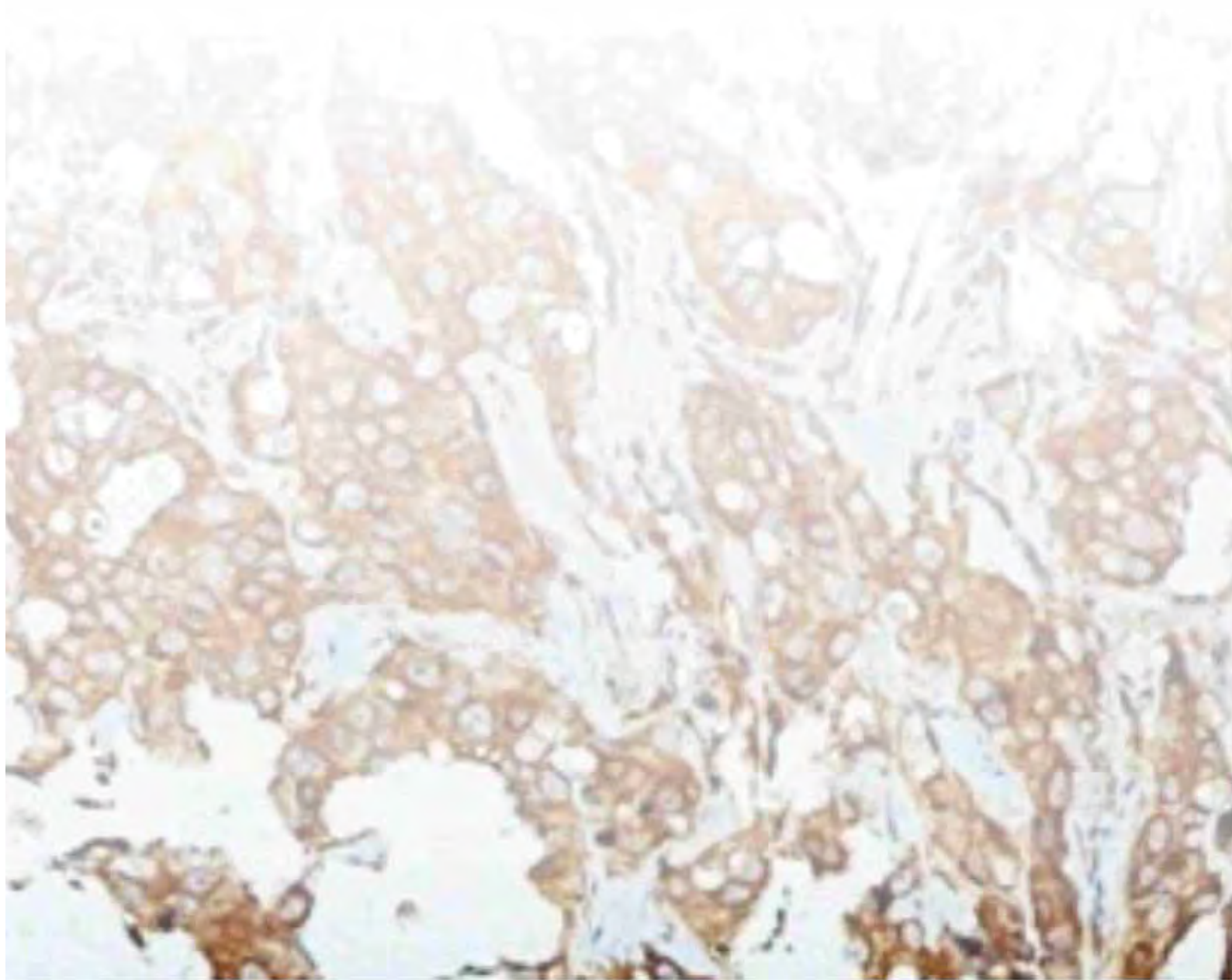
Dedicatória



Aos meus amores, Ana Beatriz e Vinícius. Minhas verdadeiras teses de doutorado! Motivo maior da minha busca por crescimento profissional.

À Bianca, amiga e amada, sem você esta tese não teria sucesso. Obrigado por me ajudar, me incentivar e, acima de tudo, por estar sempre ao meu lado.

Agradecimientos



Agradeço primeiramente a Deus, que permitiu que eu pudesse ser médico nesta vida. Tenho o privilégio de poder ajudar inúmeros pacientes com diagnóstico de câncer - mais especificamente com câncer de mama - nas diversas fases da neoplasia (da prevenção aos cuidados paliativos). Obrigado pela dupla oportunidade de prestar assistência e pesquisar.

À professora Dra Mariângela Esther Alencar Marques, pelo carinho e atenção a mim sempre dispensados, mesmo em momentos inadequados, como aos finais de semana.

Aos meus pais, exemplos de vida. Sempre aptos a me ajudar, independente do momento ou do motivo. Obrigado por me incentivarem a estudar, desde tenra idade.

A minha querida irmã Yara (sempre amiga e leal) e seu esposo Marcelo Maia, pela troca de experiências acadêmicas, incentivo e amizade.

A minha eterna orientadora profa. Dra. Silvia Regina Rogatto. Exemplo de pesquisadora correta e dedicada à ciência.

Ao Dr. Cristovam Scapulatempo, pelo importante auxílio na análise imunohistoquímica deste estudo.

Agradeço ao Sr. Odireli e demais funcionários do SAME do Hospital AC Camargo, pela disponibilidade em separar prontuários médicos para minha avaliação.

Aos médicos residentes do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos, pela ajuda na seleção de casos tipicamente positivos e negativos e fotografia dos mesmos.

Aos técnicos do Laboratório de Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp, especialmente ao Marquinho e a Celene, pela ajuda essencial na confecção das lâminas para imunohistoquímica.

A doutoranda Francine Blumental Abreu, pelo valioso auxílio na coleta de dados clínicos dos prontuários médicos.

Ao Prof Odair Carlito Michelin (Daya), meu mestre, meu amigo, incentivador de minha incursão na carreira acadêmica. Por me ensinar que o paciente merece muito mais que uma conduta científica, ele merece atenção e respeito.

Aos funcionários do setor de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelas orientações e disponibilidade.

À Vânia, da PG Patologia, pela presteza em responder às minhas dúvidas e solicitações.

A todos os colegas do Departamento de oncologia clínica de Barretos, especialmente aos Drs João Nunes, Caio e João Paulo, por permitirem que eu me ausentasse algumas vezes para dedicar-me a esta tese.

Aos Drs. Sebastião, Rafael Gaiolla e Júlio César Donato, pela convivência harmoniosa durante minha atuação em Botucatu.

À equipe de Cuidados Paliativos do Hospital de Câncer de Barretos, pelo incentivo à pesquisa, pela amizade e ajuda quando necessário.

À Rúbia, funcionária do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital AC Camargo, por entender minha dificuldade em resolver pendências à distância e me auxiliar sempre que possível.

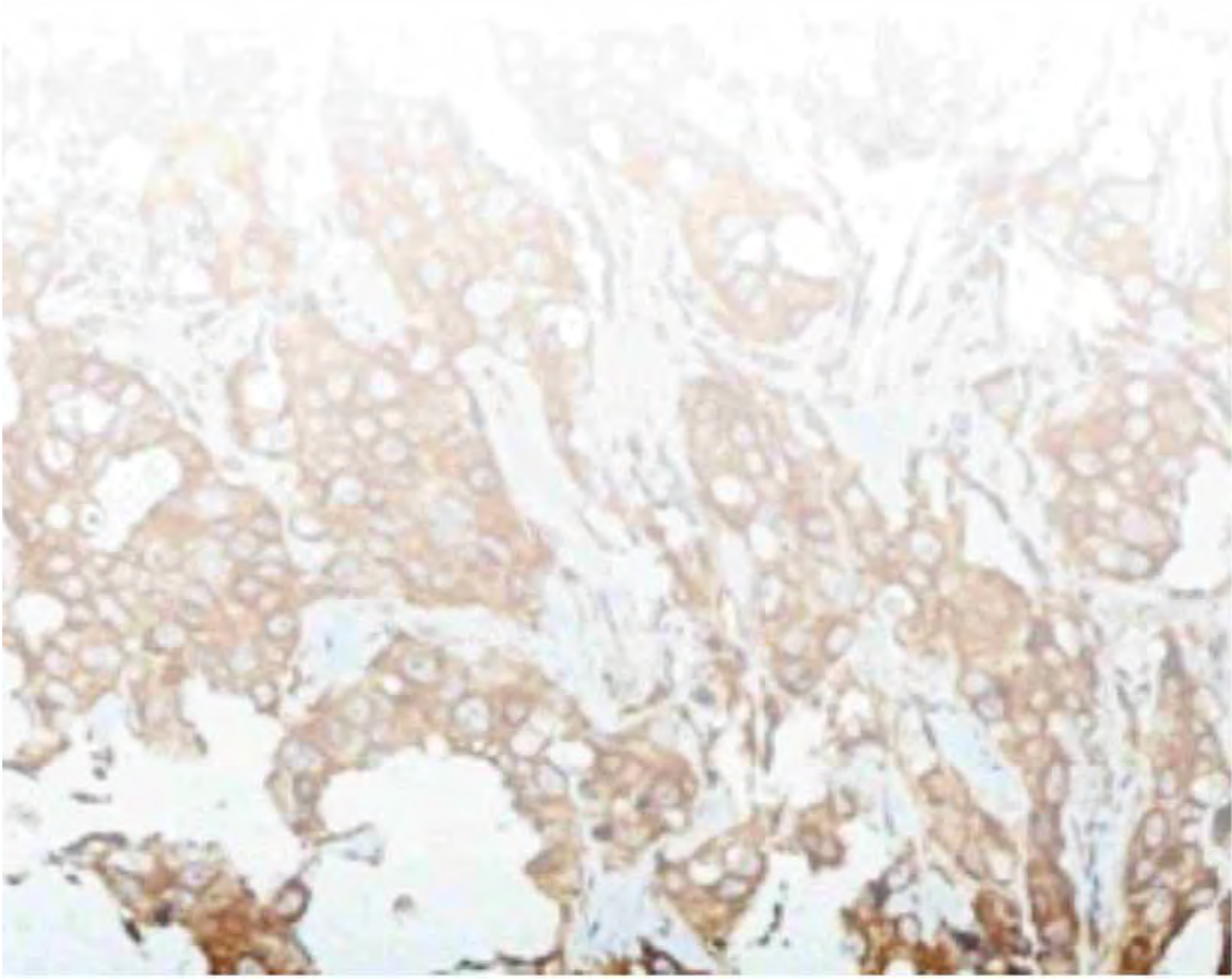
Ao Rogério, do Laboratório NeoGene (Hospital AC Camargo, São Paulo), pela disponibilidade em me auxiliar no envio de documentos de São Paulo.

Agradeço ao Hospital de Câncer de Barretos, pelo incentivo para que eu continuasse esta pesquisa após minha mudança para Barretos-SP. Agradeço também por permitir minha inclusão no Programa de Auxílio e Incentivo ao Pesquisador (PAIP), com financiamento para viagens e eventos relacionados à minha tese.

Aos funcionários do Núcleo de Apoio ao Pesquisador (NAP), do Hospital de Câncer de Barretos, pelo auxílio técnico metodológico.

Agradeço a todos as pacientes participantes desta pesquisa, que de alguma forma, estão promovendo o progresso médico-científico.

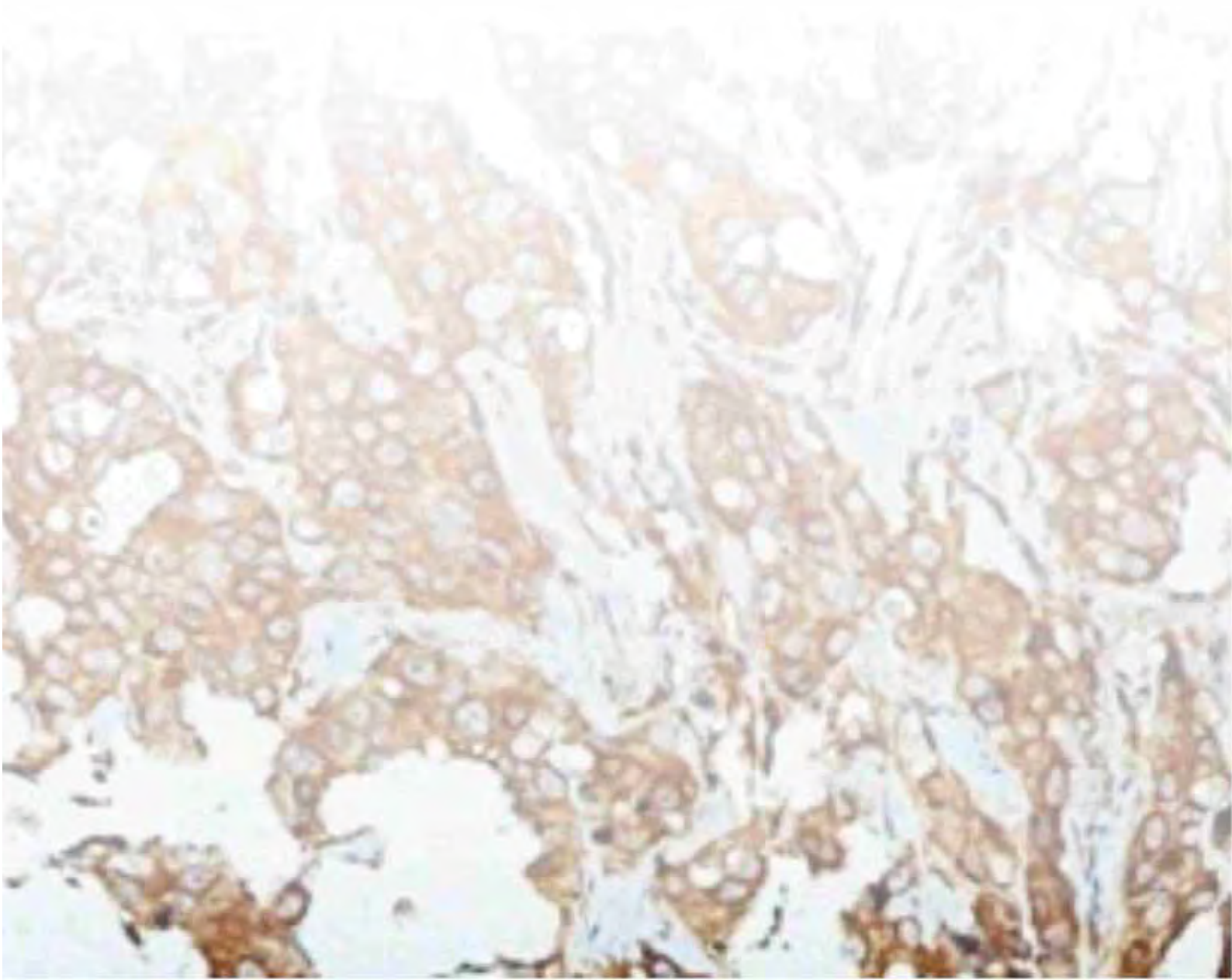
Resumo



O câncer de mama (CM) representa um importante problema de saúde pública no mundo, com aproximadamente 1.400.000 casos diagnosticados e 460.000 mortes por ano. É considerada uma doença heterogênea, com alterações em diversas vias de sinalização molecular. Tanto os marcadores prognósticos quanto os preditivos são de grande importância para a tomada de decisões terapêuticas. No caso do CM operado, os marcadores prognósticos ajudam a determinar se a paciente necessita de tratamento adicional e os marcadores preditivos auxiliam o clínico a decidir qual tratamento a ser utilizado. Desta forma, o melhor conhecimento dos marcadores prognósticos e preditivos conhecidos e a identificação de novos marcadores, poderão auxiliar o tratamento de pacientes com CM de forma mais adequada. Dois marcadores tumorais com possíveis implicações clínicas são o TGF- β 1 e o seu receptor TGF- β RII. Em relação ao impacto preditor de resposta a quimioterapia, os referidos marcadores ainda não foram devidamente estudados. Quanto ao papel prognóstico, os estudos em literatura são contraditórios. Acredita-se que o TGF- β atue de forma diferente em função do tipo celular e do contexto biológico envolvido. Assim, é supressor tumoral nos estágios iniciais da carcinogênese e promotor tumoral nos estágios tardios. O momento da troca de papéis não está estabelecido, porém, sabe-se que, em um mesmo tumor, o TGF- β pode atuar tanto como supressor quanto como promotor tumoral simultaneamente. Em face da complexidade biológica do TGF- β , optou-se por estudar um grupo homogêneo de mulheres com CM em estágio TNM III, com longo período de seguimento clínico, submetidas à quimioterapia neoadjuvante (QtNeo) baseada em doxorrubicina e também à quimioterapia adjuvante. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão protéica do TGF- β 1 e TGF- β RII em amostra de CMs e correlacionar com as taxas de resposta clínica e patológica, ocorrência de metástase à distância e análise de sobrevida. Para tanto, foram analisadas 110 amostras de CM dispostas em lâmina de *tissue microarray* pela técnica de imunohistoquímica. Os resultados mostraram que os marcadores analisados não apresentam papel preditor de resposta à QtNeo. Foi observado também que os CMs com TGF- β RII-negativo apresentam maior chance de desenvolvimento de metástases, especificamente as pulmonares e ósseas, mas não as hepáticas e cerebrais. Além do mais, os CMs negativos para o TGF- β RII evoluem de forma pior, com menores sobrevidas livre de doença e global, mesmo após análise multivariada. De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar criteriosamente o papel preditor de resposta à quimioterapia dos marcadores TGF- β 1 e TGF- β RII em CMs. Esses dados indicam que o TGF- β RII deva ser considerado um marcador tumoral relevante na carcinogênese do CM, com provável implicação prognóstica.

Palavras-chave: Análise de sobrevida; Fator transformador de crescimento beta 1; Imunohistoquímica; Receptor 2 do fator transformador de crescimento beta; Neoplasias mamárias.

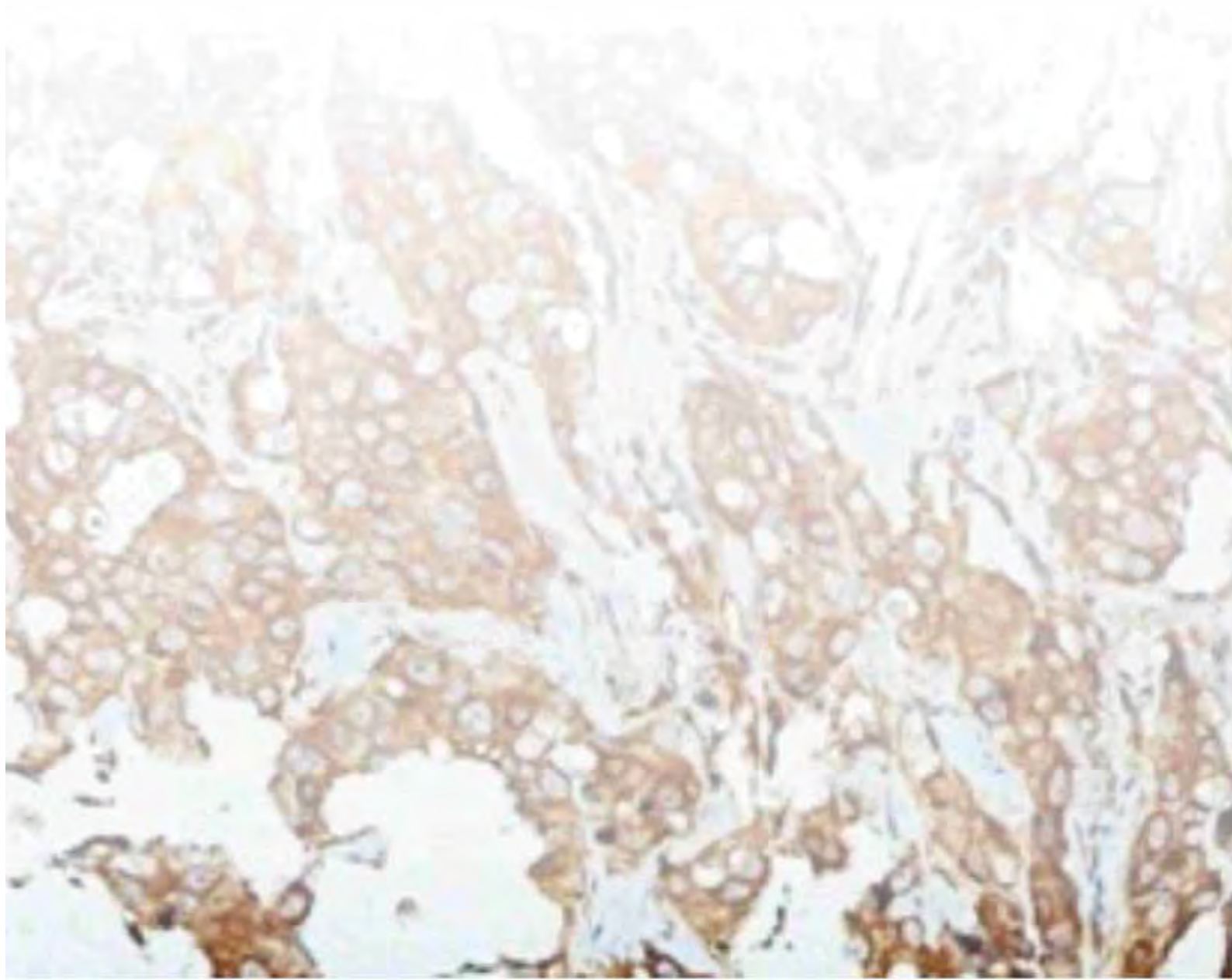
Abstract



Breast cancer (BC) represents an important public health problem worldwide, with approximately 1.4 million new cases and 460,000 deaths per year. It is considered a heterogeneous disease with changes in several molecular signalling pathways. Both the predictive and prognostic markers are important for making therapeutic decisions. In the case of operated BC, prognostic markers help to determine if the patient needs additional treatment and predictive markers help the clinician to decide which treatment to use. Thus, a better knowledge of known predictive and prognostic markers and the identification of new markers, may improve the treatment of BC patients. Two tumor markers with potential clinical implications are TGF- β 1 and its receptor TGF- β RII. Regarding the prediction of response to cancer chemotherapy, these markers have not been adequately studied. Considering its prognostic value, published studies are contradictory. It is believed that the TGF- β acts differently depending on the cell type and the biological context involved. Thus, it acts as a tumor suppressor in the early stages of carcinogenesis and as a tumor promoter in later stages. The moment of role switch is not established, however, it is known that in the same tumor, TGF- β can act as both tumor suppressor and promoter simultaneously. Given the biological complexity of TGF- β , we chose to study a homogeneous group of women with TNM stage III BCs comprising tumors with long follow-up period, submitted to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy (NAC) and adjuvant chemotherapy as well. Thus, the aim of this study was to evaluate the protein expression of TGF- β 1 and TGF- β RII in a sample of BCs and to correlate it with clinical and pathological response rates, occurrence of distant metastasis, and survival analysis. To this end, we analyzed 110 samples of BCs arranged in tissue microarray by means of immunohistochemistry. The results showed that the markers analyzed were not predictive factors of response to NAC. It was also observed that the TGF- β RII-negative BCs have a higher risk to metastasize to lungs and bone, but not to liver and to brain. Moreover, TGF- β RII-negative BCs evolve significantly poorer, with both lower disease-free survival and overall survival, even after multivariate analysis. According to our knowledge, this is the first study to carefully evaluate the role of predictive markers of chemotherapy response to TGF- β 1 and TGF- β RII in BCs. These data indicate that TGF- β RII should be considered a relevant tumor marker in carcinogenesis of the CM with probable relevant prognostic impact.

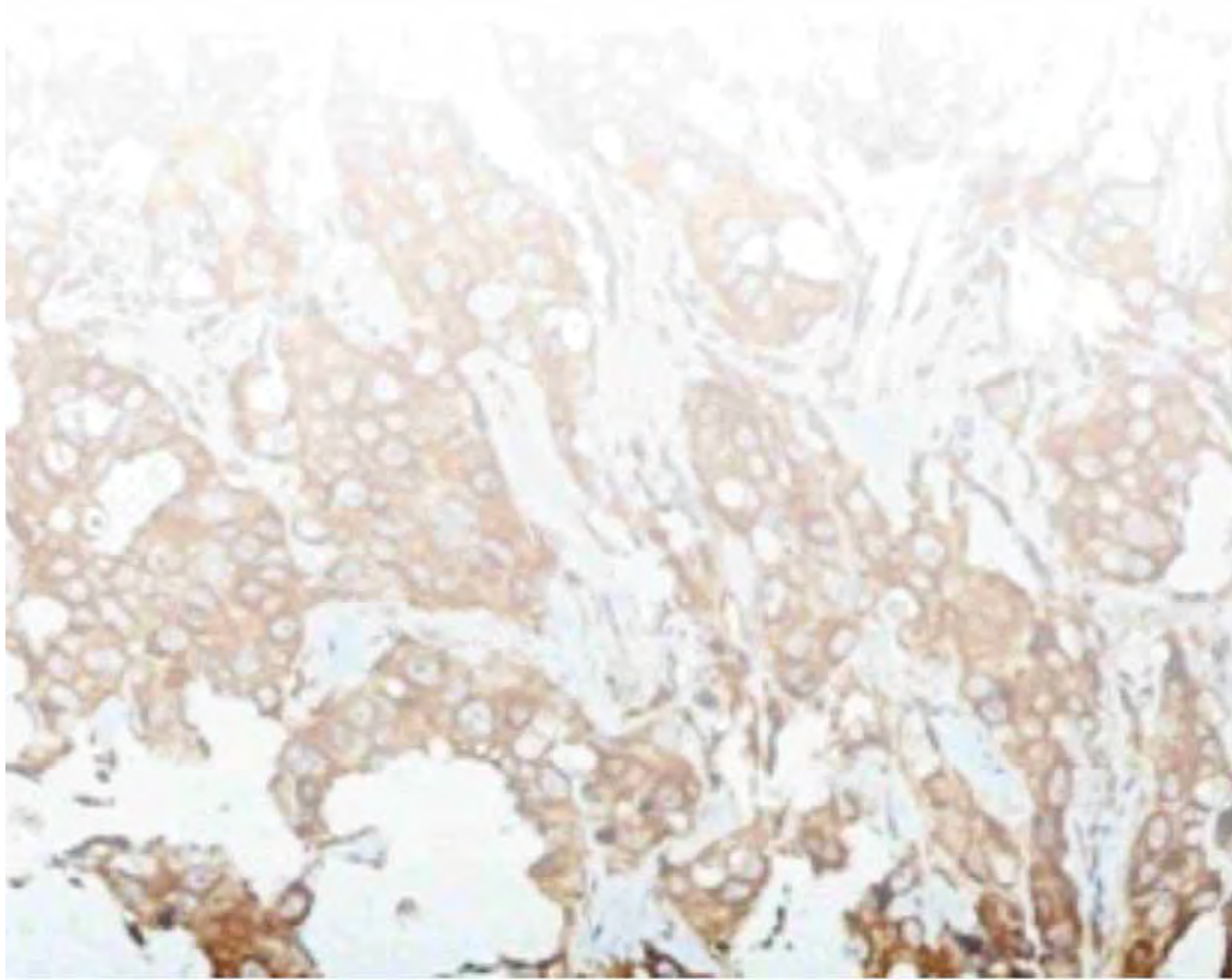
Palavras-chave: Survival analysis; transforming growth factor beta 1; Immunohistochemistry; transforming growth factor beta receptor II; Breast neoplasms.

Lista de Abreviaturas



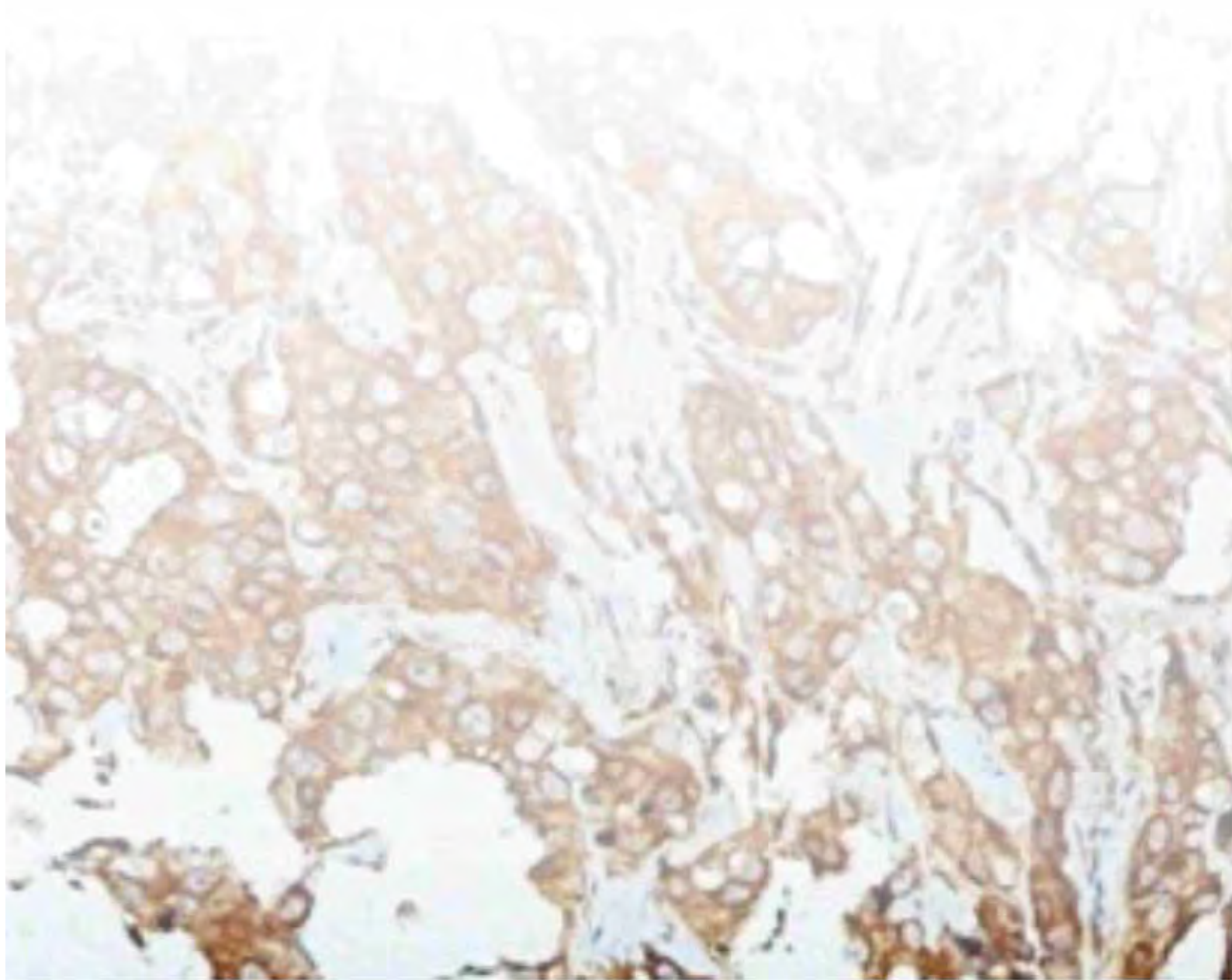
CK	Citoqueratina
CM	Câncer de mama
cPARP	proteína citopasmática Poliadenosina Difosfato Ribose Polimerase
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EUA	Estados Unidos da América
FABP7	proteína ligante de ácidos graxos 7
FISH	<i>Fluorecent In Situ Hybridization</i>
GH	grau histológico
IA	inibidores da aromatase
IHQ	imunohistoquímica
PD	progressão de doença
PLS	pesquisa do linfonodo sentinela
QT	quimioterapia
QtNeo	Quimioterapia neoadjuvante
RE	receptor de estrógeno
RP	receptor de progesterona
RPC	resposta patológica completa
RT	radioterapia
SERM	modulador seletivo do receptor de estrógeno
SG	sobrevida global
SLD	sobrevida livre de doença
TEM	transição epitélio-mesenquimal
THN	tratamento hormonioterápico neoadjuvante
TMA	Tissue microarray
TOPO2A	topoisomerase II alfa
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante Beta
TGF-βRI	receptores de TGF-β do tipo I
TGF-βRII	receptores de TGF-β do tipo II
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único

Índice



Lista de Abreviaturas	16
1. Revisão da Literatura.....	19
1.1- Câncer de mama: epidemiologia, histologia e perfis moleculares.....	20
1.2- Câncer de mama: Histórico do tratamento.....	23
1.3- Tratamento Quimioterápico Adjuvante	24
1.4- Tratamento Quimioterápico Neoadjuvante.....	26
1.5- Marcadores Prognósticos e Preditivos de resposta em Câncer de Mama.....	28
1.6- O Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF-β)	31
1.7- Marcadores prognósticos no câncer de mama: TGF-β1 e TGF- βR II..	34
1.8- Marcadores preditivos de reposta à quimioterapia no câncer de mama: TGF-β e seu receptor TGF- βRII.....	36
2. Justificativa	37
3. Objetivos	39
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4. Referências	41
4.1 Manuscrito	52
4.2 Anexos	76

Revisão de Literatura



1.1 - Câncer de mama: epidemiologia, histologia e perfis moleculares

A maioria dos cânceres em países industrializados é representada por tumores sólidos derivados de tecidos epiteliais, como os carcinomas de mama, pulmão, trato gastrointestinal e próstata (Woefle *et al.*, 2003; Pantel & Woefle, 2004). Anualmente, o câncer de mama (CM) é responsável por 300.000 mortes e um milhão de casos novos no mundo (McPherson *et al.*, 2000, Ozbas *et al.*, 2003; Ministério da Saúde, 2009). As estimativas da *American Cancer Society* para 2010, nos Estados Unidos da América, foram de 209.060 casos incidentes de CM e 40.230 mortes secundárias à doença (Jemal *et al.*, 2010). A incidência de CM na União Européia é de 110,3/100.000 habitantes com uma mortalidade de 25/100.000 (Aebi *et al.*, 2010).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, foram estimados para o ano de 2010, 49.240 novos casos de CM. Na região Sudeste o CM é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos novos por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2009).

Para o adequado entendimento de aspectos clínico-patológicos do CM, é necessário destacar alguns aspectos histológicos da mama humana normal. Esta é composta de seis a dez sistemas de ductos principais. O epitélio escamoso queratinizado da pele adentra nos orifícios do mamilo e, abruptamente, modifica-se para uma dupla camada de epitélio cuboidal que reveste os ductos mamários. Nas mulheres adultas, os ductos terminais se ramificam em conglomerados de pequenos ácinos, chamados de lóbulos. Os ductos terminais e os lóbulos mamários associados formam as unidades ducto-lobulares terminais. Estas unidades abrigam a maioria dos CMs. Dois tipos de células revestem os ductos e os lóbulos: as células mioepiteliais e as epiteliais luminais. As células mioepiteliais (contráteis) auxiliam na ejeção do leite durante a lactação e atuam como suporte estrutural aos lóbulos. As células epiteliais luminais revestem as células mioepiteliais. O estroma mamário é composto - dentre outras estruturas celulares - por fibroblastos e adipócitos (Lester, 2010; Dimri *et al.*, 2005) . A **Figura 1** exemplifica a estrutura da mama normal.

Os carcinomas de mama podem ser divididos em não invasivos (ou *in situ*) e invasivos. Os carcinomas *in situ* são compostos por células neoplásicas limitadas

aos ductos ou lóbulos, não ultrapassando a membrana basal. Os carcinomas invasivos ultrapassam a membrana basal, invadindo o estroma adjacente e tendo capacidade de disseminação à distância por vias hematogênica e/ou linfática. Aproximadamente 80% dos CMs são de origem ductal e 10% lobular. As outras histologias são menos freqüentes (Lester, 2010).

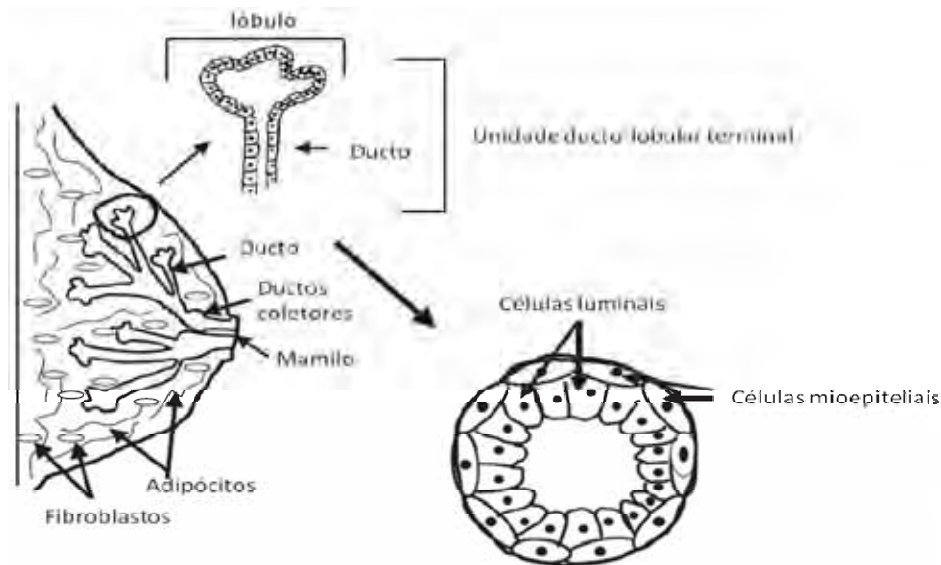


Figura 1. Representação da estrutura da glândula mamária normal (Adaptado de Dimri *et al.*, 2005).

O CM é uma doença caracteristicamente heterogênea, com fenótipos distintos clinicamente. Esta diversidade clínica, há muito notada, pôde ser mais bem estudada com o avanço das técnicas moleculares, especialmente com os *microarrays* de cDNAs ou oligonucleotídeos. Esta metodologia permitiu o estudo simultâneo da expressão de milhares de genes em tumores distintos ao mesmo tempo. Análises não supervisionadas puderam agrupar tumores biologicamente relacionados e identificaram subtipos distintos de CMs (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001).

Os CMs se agrupam basicamente em dois grandes grupos molecularmente distintos: (1) luminais e (2) não luminais. O nome “luminal” deriva da similaridade de expressão entre estes tumores e o epitélio luminal da mama normal, que frequentemente expressa as citoqueratinas (CKs) 8 e CK18. Os CMs subtipo luminal podem ser subdivididos em pelo menos duas classes: luminal A e luminal B. Os

tumores luminais A (aproximadamente 40% dos CMs) são aqueles com elevada expressão dos receptores hormonais, menor expressão de genes relacionados com proliferação celular e melhor prognóstico (Sotiriou *et al.*, 2003; Voduc *et al.*, 2010). Os CMs subtipo luminal B apresentam menor expressão dos genes relacionados ao receptor de estrógeno (RE), expressão variada do gene *HER-2* e expressão de genes relacionados ao *cluster* de fatores proliferativos. Assim, os CMs subtipo luminal B tem se mostrado mais agressivos e com prognóstico pior que os luminais A (Voduc *et al.*, 2010).

Dentre os tumores não-luminais, foram identificados três subtipos com expressões gênicas distintas: subtipos basal-símile, ERBB2+ e “mama normal”. Os tumores basal-símile se caracterizam pela ausência de expressão dos receptores hormonais e do *HER-2* e também pela expressão de marcadores típicos das células mioepiteliais (CK basais - CK5, CK14 e CK17, P-caderina, p63 e laminina) (Lester, 2010). O diagnóstico de um tumor basal-símile acarreta o pior prognóstico dentre os subtipos referidos anteriormente (Voduc *et al.*, 2010). O subtipo ERBB2+ se caracteriza pela expressão de genes localizados na região 17q22.24, que inclui o *HER-2* e o *GRB7*. Os tumores do subtipo ERBB2+ apresentam características agressivas e prognóstico ruim. Atualmente, com o uso rotineiro do trastuzumabe – que inibe o receptor de transmembrana *HER-2* – estes tumores apresentam história natural marcadamente diferente. Os tumores classificados como subtipo “mama normal” apresentam elevada expressão de genes de tecido adiposo e de outros tipos celulares não epiteliais expressos na mama normal. A existência real e relevância clínica deste último subtipo são ainda indefinidas.

Recentemente, foi identificado um subtipo diferente de neoplasias mamárias denominado “*Claudin-low*”. Estes tumores são caracterizados por expressão diminuída ou ausente de genes de adesão celular (por exemplo, Claudinas 3, 4, 7 e E-caderina) e marcadores de superfície celular de células luminais diferenciadas (EpCAM e MUC1). Os tumores “*Claudin-low*” têm características de células-tronco mamárias (CD44⁺/CD24^{low} e ALDH1A1⁺), expressão aumentada de marcadores característicos da transição epitélio-mesenquimal (TEM) e de genes de resposta imunológica (Prat *et al.*, 2010). Estudo recente mostrou que o uso exógeno dos fatores de crescimento TGF- β e TNF α foi capaz de induzir a TEM em células de CM luminal, gerando tumores com características de células-tronco de CM

(CD44⁺/CD24^{-/low}), com fenótipo “claudin-low” e resistentes ao tratamento com quimioterapia citotóxica (Asiedu *et al.*, 2011).

Atualmente, tem sido adotada uma classificação fenotípica baseada em achados de imunohistoquímica (IHQ), que se correlaciona clinicamente com achados de cDNA *microarray* e com o prognóstico das pacientes. Alguns autores advogam o uso de 5 marcadores - RE, receptor de progesterona (RP), HER-2, CK5/6 e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) - por IHQ na tentativa de melhor identificar os subtipos moleculares já conhecidos. Desta forma, os tumores do subtipo luminal se caracterizam por RE e/ou RP positivos, os tumores ERBB2+ se caracterizam por HER-2 positivo e os tumores basal-símile com triplo negatividade para RE, RP e HER-2 e expressão aumentada da CK5/6 e/ou EGFR (Nielsen *et al.*, 2004). De forma simplificada, o último consenso do Congresso de St Gallen (Goldhirsch *et al.*, 2011) sugere a seguinte classificação baseada em achados de IHQ:

- **Luminal A:** RE+ e/ou RP+ e HER-2-;
- **Luminal B (HER-2+):** RE+ e/ou RP+ com HER-2 superexpresso ou amplificado;
- **Luminal B (HER-2-):** RE+ e/ou RP+, HER-2- e Ki-67 elevado;
- **Basal-símile:** RE-, RP-, HER-2- com diferenciação ductal;
- **ERBB2+:** HER-2 superexpresso ou amplificado, com RE- e RP-.

1.2 - Câncer de mama: Histórico do tratamento

Sabe-se que a primeira descrição, que se tem conhecimento, de um caso de CM provém de 1600 anos antes de Cristo, pelo Papiro de Edwin Smith. Naquela época o tratamento era bastante limitado; ou se queimava o tumor com fogo ou se cortava com instrumentos cortantes rudimentares (Robinson, 1986). Leônidas, um médico grego que trabalhava na escola médica de Alexandria, descreveu em detalhes a primeira cirurgia de mastectomia, que provavelmente ocorreu no século I.

Nos séculos XVI e XVII, cirurgiões famosos à época relataram experiências com mastectomias agressivas, rápidas e com a característica utilização de instrumentos cirúrgicos rudimentares (Robinson, 1986). Apesar de não ter sido o primeiro a realizar uma mastectomia com linfadenectomia axilar, Willian Halsted

descreveu em 1894 cinquenta pacientes tratadas com mastectomia radical no Hospital Johns Hopkins (EUA) (Halsted, 1894-1895). Neste procedimento, eram ressecados os músculos peitorais maiores e menores, além dos linfonodos axilares. Patey e Dyson (1948), posteriormente, propuseram cirurgia com preservação do músculo peitoral maior e, mais adiante, Madden (1965) passou a preservar ambos os músculos.

A partir da década de 70, começou-se a realizar cirurgias conservadoras da mama, retirando somente o tumor maligno junto com tecido adjacente normal (com margens cirúrgicas livres de neoplasia) ou o quadrante da mama contendo o tumor. A despeito de maiores taxas de recorrências locais, Veronezi *et al.* (2002) e Fisher *et al.* (2002) demonstraram, com um seguimento de 20 anos, que a sobrevida global (SG) das mulheres com CMs submetidas à mastectomia era igual àquelas tratadas com cirurgias conservadoras da mama seguidas de radioterapia (RT) adjuvante. A história do tratamento cirúrgico do CM evidencia uma tendência ao longo do tempo em se proceder com técnicas cirúrgicas mais conservadoras, com o objetivo de manter uma adequada qualidade de vida para as mulheres tratadas, sem interferir nas chances de sobrevida em longo prazo. A pesquisa do linfonodo sentinela (PLS) é uma evidência desta tendência descrita anteriormente. Neste caso, o objetivo é identificar - dentre as pacientes com axila clinicamente negativa (cN0) - o primeiro linfonodo axilar que recebe a drenagem linfática da mama para submetê-lo à avaliação histopatológica. Nos casos com PLS negativo, poupa-se a paciente de uma posterior linfadenectomia axilar (Mabry e Giuliano, 2007).

1.3 - Tratamento Quimioterápico Adjuvante

Em relação ao CM não metastático (estádios TNM I a III) faz-se necessário definir o que são os tratamentos neoadjuvante e adjuvante. O tratamento neoadjuvante é aquele realizado antes do procedimento principal (cirurgia, no caso do CM). O tratamento adjuvante é aquele realizado após a cirurgia, com o intuito de eliminar células micrometastáticas e aumentar a SG das pacientes com CM.

Em relação ao tratamento antihormonal, o uso do modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) tamoxifeno (que atua no tecido mamário como um antagonista competitivo do RE), aumentou significativamente a sobrevida das pacientes com CM que expressavam receptores hormonais na superfície celular,

independente da idade, da presença de acometimento linfonodal e da realização de quimioterapia (QT) (Clarke *et al.*, 2005). Nas pacientes pré-menopausadas o tamoxifeno ainda é considerado o tratamento padrão de pacientes com CM receptores hormonais positivos (RE e/ou RP positivo). No climatério, a principal fonte de estrogênio é advinda da aromatização periférica dos andrógenos. O uso dos inibidores da aromatase (IA) de terceira geração, como o letrozol, o anastrozol e o exemestano, têm se mostrado superiores ao tamoxifeno nas pacientes climatéricas.

Alguns estudos mostraram aumento da sobrevida livre de doença (SLD) com o uso adjuvante dos IA por 5 anos, de início imediato após a cirurgia mamária, em comparação com o uso de 5 anos de tamoxifeno (Jones *et al.*, 1992; Coates *et al.*, 2007; Mouridsen *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009). Outros estudos demonstraram benefício do uso de tamoxifeno por 2 a 3 anos e depois, de um IA, por mais 2 a 3 anos (para completar 5 anos no total, estratégia chamada “switch”) (Mouridsen *et al.*, 2009; Boccardo *et al.*, 2005; Jakesz *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2004). A terceira estratégia de tratamento hormonioterápico adjuvante é a chamada “adjuvância estendida”, com o uso do tamoxifeno por 5 anos e, depois, de um IA por mais 5 anos (Goss *et al.*, 2005; Jakesz *et al.*, 2007; Mamounas *et al.*, 2008; Goss *et al.*, 2003). A melhor estratégia de uso dos IA no tratamento adjuvante do CM ainda encontra-se indefinida. Uma meta-análise publicada recentemente confirma o aumento do tempo de SLD com a inclusão de um IA ao tratamento adjuvante em mulheres no climatério independente da estratégia utilizada. No entanto, o aumento na SG foi evidente apenas com a estratégia “switch” (Josefsson e Leinster, 2010).

Não há dúvidas de que a QT adjuvante seja capaz de aumentar, de forma significativa, a sobrevida de pacientes com CM (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005). A principal dificuldade é identificar quais pacientes irão se beneficiar e com quais regimes terapêuticos. Bonadonna *et al.* (1985), demonstraram diminuição do risco de recorrência e morte com a utilização do regime CMF (ciclofosfamida, metotrexato e fluorouracil) em comparação com placebo, tendo sido este regime de quimioterapia o padrão durante décadas.

Na década de 80, os pesquisadores do Instituto do Câncer de Milão demonstraram uma diminuição anual de 12% e 11%, nos riscos de recorrência e morte, respectivamente, com o acréscimo de um quimioterápico antracíclico em associação ao CMF (Bonadonna *et al.*, 1985). Vários outros estudos de fase III mostraram benefício da QT adjuvante com a inclusão de um antracíclico

(habitualmente a adriamicina ou a epirrubicina). A indicação do tratamento quimioterápico adjuvante se baseia no risco estimado de recorrência da doença e também no benefício provável em diminuir o risco de recorrência no paciente em questão.

Neste sentido, dados de uma meta-análise direcionaram o uso de antracíclicos apenas para pacientes com HER-2 positivo (Dhesy-Thind *et al.*, 2008). O acréscimo de um quimioterápico do grupo dos taxanos (paclitaxel ou docetaxel) foi superior em termos de sobrevida em alguns estudos que avaliaram pacientes com CM de alto risco para recorrência (Henderson *et al.*, 1998; Mamounas *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005). Dados de uma meta-análise de 13 estudos (N=22.903) corroboram o benefício do acréscimo de um taxano no tratamento adjuvante, com diminuição do risco relativo de recorrência e morte de 17% e 15%, respectivamente (De Laurentiis *et al.*, 2008). Pacientes com CM luminal A parecem não se beneficiar do acréscimo de um taxano (Ellis *et al.*, 2009).

Vários outros agentes quimioterápicos estão sendo estudados para tratamento do CM operado, mas ainda sem benefício evidente. Por outro lado, o uso adjuvante do anticorpo monoclonal trastuzumabe, que se liga especificamente na proteína de transmembrana HER-2, mostrou aumento da SLD e provavelmente SG em pacientes com amplificação do gene *HER-2*, estando indicado para todas as pacientes operadas, com tumores ≥ 1 cm e com imunoeexpressão da proteína HER-2 (+++/3) e/ou FISH (*Fluorecent In Situ Hybridization*) mostrando amplificação gênica do *HER-2* (Dahabreh *et al.*, 2008). Sugere-se um benefício do trastuzumabe mesmo em tumores menores que 1 cm e com linfonodo negativo, porém, este dado necessita ser mais bem estudado (Banerjee e Smith, 2010).

1.4 - Tratamento Quimioterápico Neoadjuvante

A utilização da quimioterapia neoadjuvante (QtNeo) tem indicação precisa nos casos de CM localmente avançados e/ou inoperáveis. A partir dos estudos iniciais nesta situação clínica, começou-se a utilizar a QtNeo nos casos de CMs operáveis, com a intenção de aumentar as taxas de cirurgias conservadoras da mama (De Lena *et al.*, 1978; Tewari *et al.*, 2008). As principais vantagens da QtNeo são: tratar precocemente as micrometástases na tentativa de aumentar a sobrevida das

pacientes, realizar cirurgias conservadoras e avaliar a resposta ao tratamento *in vivo*. Neste sentido, a QtNeo é promissora na definição de marcadores preditivos de resposta ao tratamento antineoplásico, pois é um ótimo modelo biológico para avaliação de resposta terapêutica e em curto prazo de tempo.

O estudo *National Adjuvant Breast and Bowel Project* (NASBP) B-18 comparou quatro ciclos de quimioterapia neoadjuvante com regime AC (doxorubicina 60 mg/m² e ciclofosfamida 600 mg/m², i.v., a cada 21 dias) com os mesmos quatro ciclos administrados após a cirurgia. Após 16 anos de seguimento, não foi observado diferença tanto em termos de SLD quanto de SG entre os grupos analisados (Rastogi *et al.*, 2008). Este estudo mostrou um aumento estatisticamente significativo de 8% no número de cirurgias conservadoras da mama quando as pacientes eram submetidas a QtNeo.

Outro grande estudo de fase III - *European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer* - mostrou um aumento da taxa de cirurgias conservadoras da mama de quase 30% (Gianni *et al.* 2009b). O estudo NSABP-B27 testou a inclusão de um taxano, da seguinte forma: grupo 1 (N=784)- quatro ciclos neoadjuvantes de AC seguido de cirurgia; grupo 2 (N=783)- quatro ciclos neoadjuvantes de AC seguido de mais quatro ciclos neoadjuvantes de docetaxel e cirurgia em sequência e grupo 3 (N=777)- quatro ciclos neoadjuvantes de AC seguido de cirurgia e depois docetaxel adjuvante por quatro ciclos. Não foi observada qualquer alteração em termos de SLD ou de SG entre os grupos. No entanto, a inclusão de um taxano à QtNeo (grupo 2) praticamente dobrou a taxa de resposta patológica completa (RPC) em comparação com apenas 4 ciclos de AC (grupos 1 e 3) (26% *versus* 13%) (Rastogi *et al.*, 2008).

As taxas de RPC nos vários estudos de fase III, variaram entre 7% (braço AT do estudo Geparduo) a 51% (braço incluindo lapatinibe, trastuzumabe e paclitaxel do estudo NEOAllto) (Moreno-Aspitia, 2011). Portanto, as taxas de RPC variam bastante, em função do estadiamento inicial, das características biológicas dos tumores incluídos nos estudos e do tipo de QtNeo utilizado. Uma informação robusta advinda dos estudos que avaliaram a QtNeo foi a de que as pacientes que atingem a RPC apresentam SLD e SG significativamente superiores as das pacientes que não atingem a PCR, independente do tipo de tumor ou estadiamento clínico inicial. A ocorrência de RPC diminuiu o risco de óbito pelo CM em 68% e 64% nos estudos NSABP-B18 e NSABP-B27, respectivamente. (Rastogi *et al.*, 2008).

Baseado no benefício observado com o uso do trastuzumabe no tratamento adjuvante de pacientes com CM operado e também nos casos de doença metastática acredita-se que, o medicamento deva ser incluído na QtNeo de pacientes com HER-2 positivo (escore 3+ na IHQ ou FISH positivo). Em verdade, não há evidência definitiva de benefício em termos de SG em relação ao uso do trastuzumabe neoadjuvante, porém, o aumento significativo nas taxas de RPC (Budzar *et al.*, 2007; Sikov *et al.*, 2009) e a melhora da SLD observada no estudo NeOAdjuvant Herceptin (NOAH) (Gianni *et al.*, 2009) têm justificado o uso rotineiro do emprego do trastuzumabe neoadjuvante em combinação com quimioterapia citotóxica.

Nos casos de tumores localmente avançados inoperáveis em pacientes inabilitadas para receber a QtNeo (por exemplo, idosas frágeis), pode-se utilizar do tratamento hormonioterápico neoadjuvante (THN), desde que o CM expresse receptores hormonais. Prefere-se o uso do THN em tumores com subtipo histológico lobular invasivo, subtipo fenotípico Luminal A e casos com elevada expressão de receptores hormonais. Tanto o tamoxifeno (Tan *et al.*, 2001) quanto os IA (Smith *et al.*, 2005; Eiermann *et al.*, 2001) podem ser utilizados no THN, no entanto, os IA se mostram mais eficazes.

1.5 - Marcadores Prognósticos e Preditivos de resposta em Câncer de Mama

Marcadores tumorais são úteis na detecção do câncer em estágio precoce, no monitoramento da progressão da doença, na avaliação do risco de recorrência e morte na ausência de tratamento (fator prognóstico) e para prever a resposta ao tratamento (fator preditivo) (Lonning, 2003).

Tanto os marcadores prognósticos quanto os preditivos são de grande importância para a tomada de decisões terapêuticas. Os marcadores prognósticos predizem a evolução clínica de um paciente independente do tratamento realizado. Os marcadores preditivos antecipam a probabilidade de resposta ao tratamento na dependência de sensibilidade ou resistência a um dado medicamento. No caso do CM operado, os marcadores prognósticos ajudam a determinar se a paciente necessita de tratamento adicional e os marcadores preditivos auxiliam o clínico a

decidir qual tratamento a ser utilizado. Desta forma, o melhor conhecimento dos marcadores prognósticos e preditivos conhecidos e a identificação de novos marcadores, poderão auxiliar o tratamento de pacientes com CM de forma mais adequada (Weigel e Dowsett, 2010).

Os estudos de neoadjuvância são ideais para identificação de marcadores preditores de resposta ao tratamento. Estes estudos tem geralmente duração curta, fácil avaliação de resposta clínica e amostra tecidual para mensurar a resposta patológica. A identificação de marcadores preditivos isolados ou agrupados é de extrema importância nos dias de hoje, quando se dá tamanha importância para a prática da medicina personalizada.

Os marcadores preditivos de resposta ao tratamento antineoplásico mais importantes são os receptores hormonais e o HER-2, principalmente pelos seus elevados valores preditivos negativos. A expressão do RE e/ou do RP é um fator preditivo de resposta ao tratamento hormonioterápico (Rastelli e Crispino, 2008). Os maiores escores de IHQ para o RE estiveram relacionados com maior tempo de SLD no estudo de Harvey *et al.* (1999). O aumento da expressão do *HER-2* é um fator preditivo de resposta ao tratamento com o anticorpo monoclonal trastuzumabe (Vogel *et al.*, 2002). No entanto, parcela importante dos pacientes com receptores hormonais positivos tratados com hormonioterapia apresentam recorrência do câncer ou progressão de doença (PD) durante o tratamento, mostrando claramente que a célula tumoral pode possuir ou adquirir mecanismos de resistência. Este mesmo raciocínio é verdadeiro em relação ao uso do trastuzumabe em mulheres com CM HER-2 positivo. A identificação de marcadores preditores de resistência aos tratamentos referidos é relevante para a prática clínica oncológica atual.

Em relação aos marcadores preditivos de melhor resposta à QT citotóxica, podemos destacar a ausência de expressão dos receptores hormonais. Os tumores com ausência de expressão do RE apresentam maior chance de ocorrência de uma RPC em comparação com os tumores com RE positivo (7 a 8% versus 21 a 33%) (Colleoni *et al.* 2004, Ring *et al.* 2004). O HER-2 foi um marcador de melhor resposta à QT com doxorrubicina em dois estudos (Gennari *et al.*, 2008; Rody *et al.*, 2007), porém, seu papel preditivo ainda é indeterminado (Loibl *et al.*, 2005; Bozzetti *et al.*, 2006). Alguns autores acreditam que o motivo de uma maior resposta aos antracíclicos seria a co-amplificação do gene da topoisomerase II alfa (*TOPO2A*), localizado em região próxima ao gene *HER-2* no cromossomo 17 (Genari *et al.*,

2008). Pacientes com tumores triplo negativos (RE-/RP-/HER-2-) e ERBB2+ (RE-/RP-/HER-2+) apresentam maior taxa de RPC em comparação com os tumores luminais A e B (Liedtke *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010; Ono *et al.*, 2011).

Alguns possíveis marcadores preditivos de melhor resposta ao tratamento quimioterápico com adriamicina são o aumento da expressão de marcadores de proliferação celular (como o *MKI67*) (Bozzetti *et al.*, 2006), ausência de mutação no gene *TP53* (Di Leo *et al.*, 2007) e aumento da expressão do gene *TOPO2A* (Durbecq *et al.*, 2004). A expressão da proteína TUBB3 parece estar relacionada com maior resposta à QT baseada em taxanos (Galmarini *et al.*, 2008). Tumores com infiltrado linfocítico peritumoral apresentaram maior chance de RPC no estudo de Ono *et al.* (2011). O aumento de expressão da proteína citopasmática Poliadenosina Difosfato Ribose Polimerase (cPARP) se associou com maiores taxas de RPC em estudo com 630 pacientes que participaram do Trial GeparTrio (von Minckwitz *et al.*, 2011).

A pesquisa de marcadores prognósticos para o CM é importante principalmente no que tange à definição de terapia sistêmica adjuvante. Os fatores prognósticos “clássicos” que determinam evolução ruim no CM são: tamanho do tumor, presença de disseminação para linfonodos axilares, grau histológico (GH) 3 do tumor, presença de invasão linfo-vascular, aumento da expressão de marcadores de proliferação celular, e idade menor que 35 anos (Cianfrocca e Goldstein, 2004). A raça negra também parece ser um fator prognóstico ruim (Albain *et al.*, 2009). Tumores com expressão de marcadores de célula tronco ($CD44^+/CD24^{-low}$ ou ALDH1A1+) apresentam prognóstico ruim de acordo com meta-análise publicada recentemente (Zhou *et al.*, 2010). Conforme descrito anteriormente, pacientes com tumores com perfis moleculares ERBB2+ e *basal-símile* apresentam sobrevida marcadamente inferior, sendo que os tumores Luminais B têm pior evolução que os Luminais A (Voduc *et al.*, 2010).

A utilização de técnicas moleculares mais modernas permitiu a definição de novos marcadores prognósticos e preditivos, assim como identificou assinaturas moleculares e criou “ferramentas” prognósticas mais acuradas (oncotype DX, Mammaprint, adjuvant!online). No entanto, muitas pacientes com CM continuam recebendo QT citotóxica desnecessária e outras apresentando recorrência do tumor classificado inicialmente como de baixo risco para recidiva.

A via de sinalização molecular do Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- β) tem se mostrado relevante na carcinogênese mamária, tendo sido bastante estudada nos últimos anos, especialmente utilizando linhagens celulares de tumores mamários e modelos de experimentação animal. No entanto, a complexidade biológica desta via faz com que seja ainda pouco compreendida clinicamente.

1.6- O Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- β)

O TGF- β foi descrito inicialmente como indutor do crescimento derivado de ancoragem em fibroblastos murinos (Moses *et al.*, 1981). Posteriormente, foi demonstrado que estava envolvido em múltiplos processos biológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, fibrose, cicatrização, sistema imunológico e carcinogênese (Li *et al.*, 2006; Fleisch *et al.*, 2006).

A proteína apresenta três isoformas, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, em mamíferos e são codificadas por genes distintos (Elliott e Blobbe, 2005). O TGF- β ativado exerce suas funções biológicas por ligação a receptores específicos de transmembrana pelos quais tem alta afinidade. Os receptores de TGF- β do tipo I (TGF- β RI) e tipo II (TGF- β RII) contêm serina-treonina quinases em seus domínios intracelulares (Elliott e Blobbe, 2005). O receptor de TGF- β do tipo III (TGF- β RIII), também chamado de betaglicano, é uma glicoproteína sem atividade de proteína quinase que se associa fortemente ao TGF- β aumentando sua concentração na superfície celular e maximizando sua interação com os TGF- β RI e TGF- β RII (Benson, 2004; Fleisch *et al.*, 2006). O ligante TGF- β 1 pode se interagir com o TGF- β RII diretamente ou via apresentação pelo TGF- β RIII. Em seqüência, o TGF- β RII se associa (formando um heterodímero) ao TGF- β RI, com conseqüente fosforilação deste e início da cascata de sinalização intracelular via fatores de transcrição denominados Smad's. Os SMAD2 e SMAD3 (chamados de R-Smads) ativados pelo TGF- β RI se associam ao SMAD4 (Co-Smad), formando heterodímeros e translocando para o núcleo celular onde ativam a transcrição de genes alvo. Os SMAD6 e SMAD7 (I-Smads) inibem a via de sinalização do TGF- β (Miyazono *et al.*, 2003; Elliott & Blobbe, 2005).

Além de sua habilidade em estimular a via Clássica, o TGF- β também altera o comportamento celular atuando independentemente dos Smads. Na lista de efetores

não-Smad do TGF- β encontram-se: ERK1/ERK2, p38 MAPK e JNK; PI3K, AKT/PKB e mTOR; ; Ras, RhoA, Rac1 e Cdc42; NF- κ B; Par6 e outras vias. A **Figura 2** esquematiza a via de sinalização do TGF- β em nível celular, tanto via Canônica quanto a via não Canônica (Tian *et al.*, 2011).

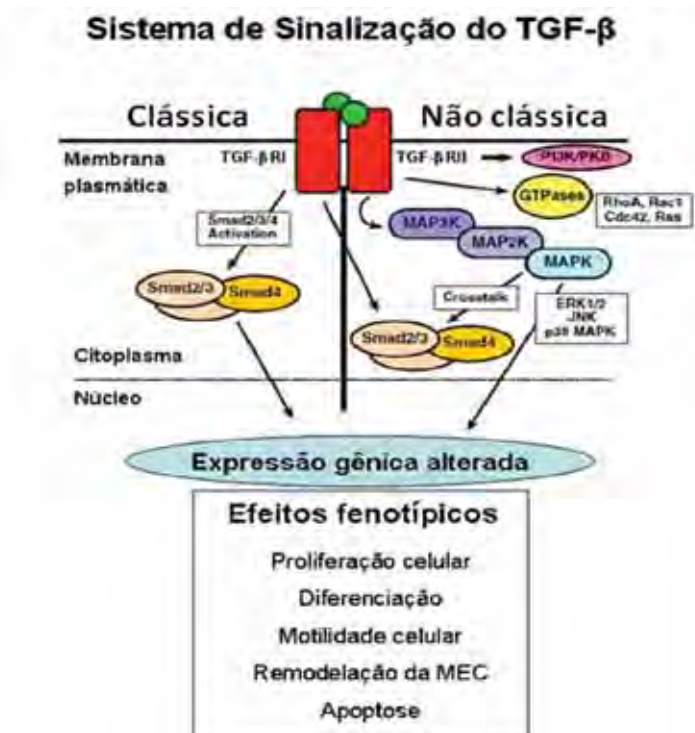


Figura 2. Representação esquemática da via de sinalização celular do TGF- β (Adaptado de Tian *et al.*, 2011).

O TGF- β 1 atua como supressor tumoral em estágios iniciais da carcinogênese, por inibir a proliferação celular, induzir apoptose e regular a autofagia celular; no entanto, é promotor tumoral em estágios tardios, por promover migração, degradação da matriz extracelular, angiogênese, imunossupressão do hospedeiro, induzir a TEM e promover a manutenção das células-tronco neoplásicas (Dumont & Arteaga, 2000; Muraoka-Cook *et al.*, 2005; Fleisch *et al.*, 2006; Jakowlew, 2006; Meulmeester *et al.*, 2011, Irman, 2011). Em algum momento do processo da carcinogênese o TGF- β muda seu papel; de supressor passa a ser promotor tumoral. O momento exato desta mudança e o mecanismo que a envolve são ainda desconhecidos (“paradoxo do TGF- β ”). No entanto, a presença de mutação do *P53*, ausência de expressão do *SMAD4* e hipometilação do *PDGFR* são

algumas alterações moleculares provavelmente relacionadas neste contexto biológico (Irman, 2011).

Modelos animais com perda parcial ou completa dos genes *TGFB1*, *SMAD2* ou *SMAD3*, apresentaram maior propensão ao desenvolvimento de tumores (Tange *et al.*, 1998; Muraoka-Cook *et al.*, 2005). A expressão negativa dominante do gene *TGFBR2* resultou em um desenvolvimento mamário lóbulo-alveolar acelerado e propensão ao desenvolvimento de carcinomas mamários tanto induzidos quimicamente quanto espontâneos (Bottinger *et al.*, 1997; Gorska *et al.*, 1998; Gorska *et al.*, 2003).

Uma maneira encontrada pelas células neoplásicas para escapar da supressão tumoral promovida pela via do TGF- β é perder ou diminuir a expressão de seus receptores de superfície ou de alguns tipos de SMADs, por diversos mecanismos (Elliott e Blobel, 2005; Jakowlew, 2006). Gobbi *et al.* (2000) e Hinshelwood *et al.* (2007) encontraram importante diminuição da expressão do TGF- β RII em amostras de CMs, em nível de proteína e transcrito, respectivamente. Em estudo anterior também identificamos significativa diminuição da expressão do TGF- β RII (Paiva *et al.*, 2009).

A TEM é um processo fisiológico normal essencial para a embriogênese e cicatrização tecidual. No entanto, a TEM patológica tem sido reconhecida em algumas situações clínicas, como na inflamação, fibrose, artrite reumatóide e durante o processo de invasão e metástase do câncer (para revisão, Wendt *et al.*, 2011). No câncer, a TEM ocorre quando uma célula epitelial diferenciada passa por um processo de transdiferenciação originando uma célula com fenótipo mesenquimal. Em linhas gerais, a TEM induz diminuição da expressão da E-caderina e aumento da expressão nas células tumorais da N-caderina, vimentina, actina de músculo liso alfa e de fibronectina no estroma tumoral (Wendt *et al.*, 2011). Estas mudanças fenotípicas corroboram com um aumento da motilidade celular, propiciando invasão e metástase. As células com fenótipo mesenquimal parecem adquirir resistência ao tratamento quimioterápico. Iseri *et al.* (2011) mostraram que células da linhagem luminal MCF-7 resistentes a doxorubicina, paclitaxel e docetaxel tinham características de TEM, inclusive com aumento da expressão do TGF- β RII (Iseri *et al.*, 2011).

1.7 - Marcadores prognósticos no câncer de mama: TGF- β 1 e TGF- β RII

Koumoundourou *et al.* (2007) demonstraram que os CMs com diminuição da expressão da proteína TGF- β 1 tinham um risco 4,6 vezes maior de evoluir para metástase à distancia. Estes mesmos autores mostraram que a diminuição da expressão protéica dos SMAD2 e SMAD3 fosforilados (pSMAD2/3) foi fator independente de menor SLD. De forma oposta, a expressão protéica de TGF- β 1 estava correlacionada positivamente, e de forma independente de outros fatores prognósticos, com menor tempo de SLD em uma pequena amostra de carcinomas invasores com seguimento mediano de 20 meses (Gorsch *et al.*, 1992).

Buck *et al.* (2005) avaliaram por IHQ a expressão de TGF- β RI e TGF- β RII em 246 amostras de CM e mostraram que a presença do RE pode influenciar nos efeitos do TGF- β . No grupo de tumores que não expressavam o RE a expressão de TGF- β RII estava associada com maior agressividade e menor tempo de sobrevida. No entanto, a ausência de expressão simultânea das proteínas RE e TGF- β RII, estava associada a tempo de sobrevida prolongado, similar aos tumores que expressavam RE. Os autores concluíram que a expressão protéica do TGF- β RII estava relacionada com evolução desfavorável em pacientes com expressão protéica diminuída do RE.

Recentemente, evidenciamos um importante papel prognóstico dos marcadores TGF- β 1 e TGF- β RII. A maior expressão do TGF- β 1 esteve relacionada, de forma independente, com maior SLD em pacientes com CM. Os CMs HER-2-/TGF- β RII+ apresentaram maiores SLD e SG, de forma significativa e independente de outros marcadores prognósticos (Paiva *et al.*, 2009).

Analisados em conjunto, os estudos que avaliaram a expressão do TGF- β 1 e seu receptor TGF- β RII em relação ao prognóstico do CM são contraditórios, sendo necessários novos estudos. A **Tabela 1** mostra os estudos que avaliaram o TGF- β 1 e o TGF- β RII quanto ao papel prognóstico em pacientes com CM.

Tabela 1. Estudos que avaliaram o impacto prognóstico dos marcadores TGF- β 1 e TGF- β RII em amostras de CM humano.

Autor	Marcador	N	Técnica (alvo)	Critério de positividade	Impacto prognóstico
Gorsch <i>et al.</i> , 1992	TGF- β 1	57	IHQ (proteína)	Intensidade (ausente/ baixa vs. alta)	Menor SLD (independente)
Koumoundourou <i>et al.</i> , 2007	TGF- β 1	61	IHQ (proteína)	>10% de células imunocoradas	Maior SLD (análise uivarida)
Buck <i>et al.</i> , 2005	TGF- β RII	246	IHQ* (proteína)	Intensidade 0 vs 1-3	Menor SG, especialmente em tumores com RE negativo
Paiva <i>et al.</i> , 2009	TGF- β 1 e TGF- β RII	324	IHQ* (proteína)	Intensidade 0 vs 1-3	TGF- β 1: Maior SLD (independente) TGF- β RII: Maiores SLD e SG em tumores HER-2 negativo (independente)
Marrogi <i>et al.</i> , 1997	TGF- β 1	19	PCR semiquantitativa (mRNA)	-----	Expressão mais elevada no grupo de pacientes com maior SLD
Desruisseau <i>et al.</i> , 2006	TGF- β 1	193	Elisa (proteína)	-----	Menor SLD (independente), especialmente nas pacientes N ₀

* Utilização de *tissue microarray* (TMA)

1.8 - Marcadores preditivos de resposta à quimioterapia no câncer de mama: TGF- β e seu receptor TGF- β RII

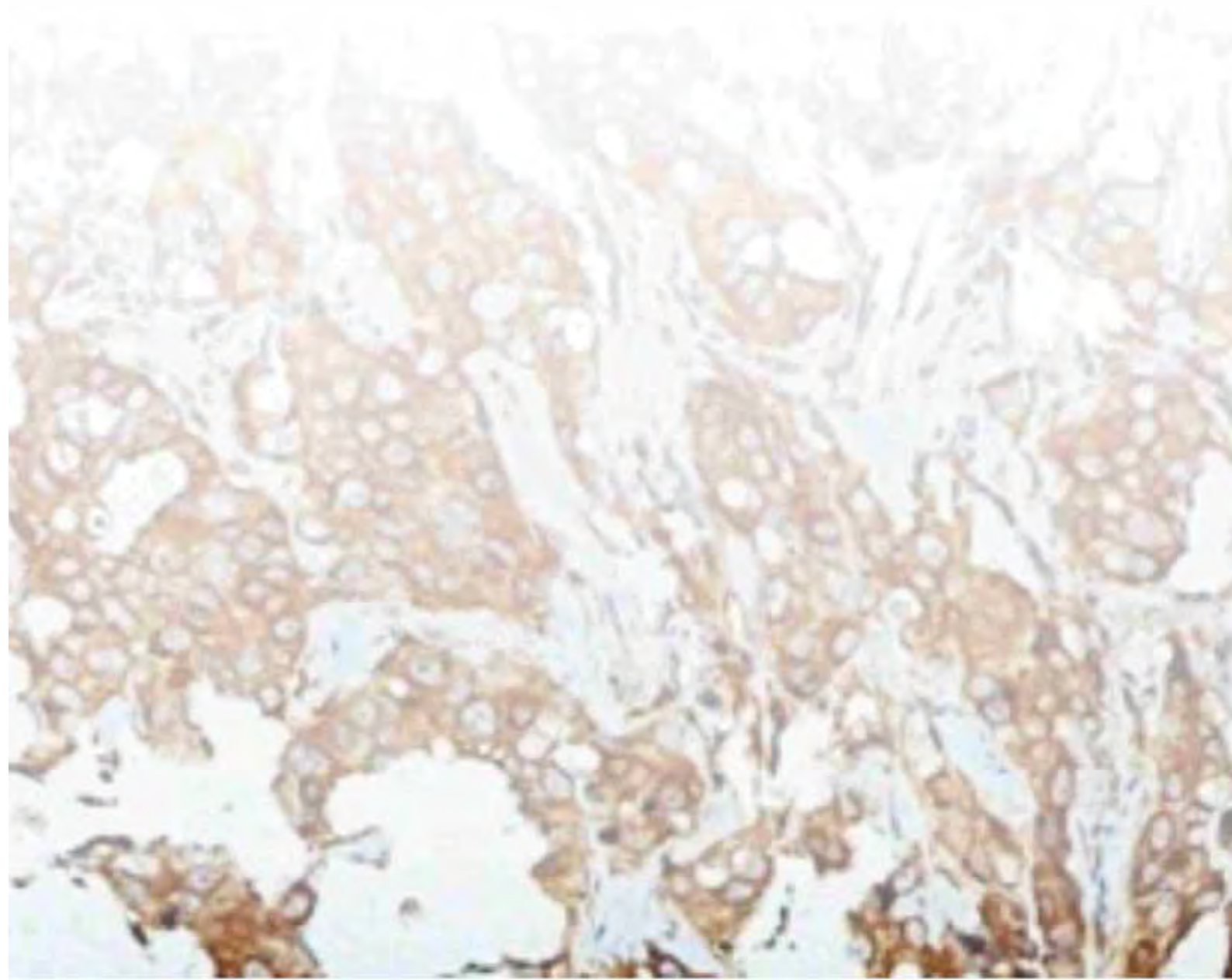
Ciftci *et al.* (2003) demonstraram que o TGF- β 1, em altas concentrações, é capaz de diminuir a citotoxicidade causada por alguns agentes antineoplásicos por promover parada do ciclo celular e inibição da proliferação celular. A relação do TGF- β 1 com a citotoxicidade secundária a adriamicina parece ser dependente do tipo celular avaliado. Assim, em células de CM da linhagem MDA-MB-231 o TGF- β 1 neutralizou a citotoxicidade causada pelo referido quimioterápico, porém, em células neoplásicas mamárias cultivadas da linhagem MCF-7, o TGF- β 1 foi capaz de aumentar a eficácia da adriamicina (Koutsilieris *et al.*, 1999). Kanamoto *et al.* (2002) mostraram que o TGF- β 1 inibia o reparo das quebras de fita dupla do DNA. Em células de carcinoma de pulmão da linhagem A549 o tratamento com baixas concentrações de TGF- β 1 (2 ng/mL) aumentou a citotoxicidade da adriamicina e induziu a apoptose das células neoplásicas (Filyak *et al.*, 2007).

Thuerigen *et al.* (2006) utilizaram técnica de cDNA *microarray* e conseguiram identificar 512 genes diferencialmente expressos em CMs capazes de predizer a RPC ao TQN contendo gemcitabina, epirrubicina e docetaxel. Um grande número de genes participava das vias de sinalização do RAS, resposta a dano do DNA, apoptose e, de forma interessante, do TGF- β .

O alelo Pro do TGF- β (Leu10Pro) está associado com aumento da secreção de TGF- β 1. Em mulheres indianas, a presença do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) do TGF- β (Pro/Pro) esteve relacionada, de forma significativa, com uma chance 10,5 vezes maior de RPC ao TQN. As mulheres com genótipo Leu/Leu foram as que obtiveram as menores taxas de RPC (Rajkumar *et al.*, 2008). Neste estudo, as mulheres eram tratadas com três ciclos dos regimes FAC ou CMF, concomitante a radioterapia externa. Das 250 pacientes avaliadas no estudo, 101 delas receberam QtNeo (Rajkumar *et al.*, 2008).

Como referido anteriormente, o TGF- β é um potente indutor da TEM. As células transdiferenciadas (mesenquimais) se mostraram resistentes aos antineoplásicos antracíclicos e taxanos em estudo recente já reportado (Iseri *et al.*, 2011). Em adição, o processo de TEM induzido pelo TGF-beta é capaz de gerar células tumorais “claudin-low” com fenótipo de células-tronco de CM com resistência aos antineoplásicos paclitaxel, oxaliplatina e etoposide (Asiedu *et al.*, 2011).

Justificativa

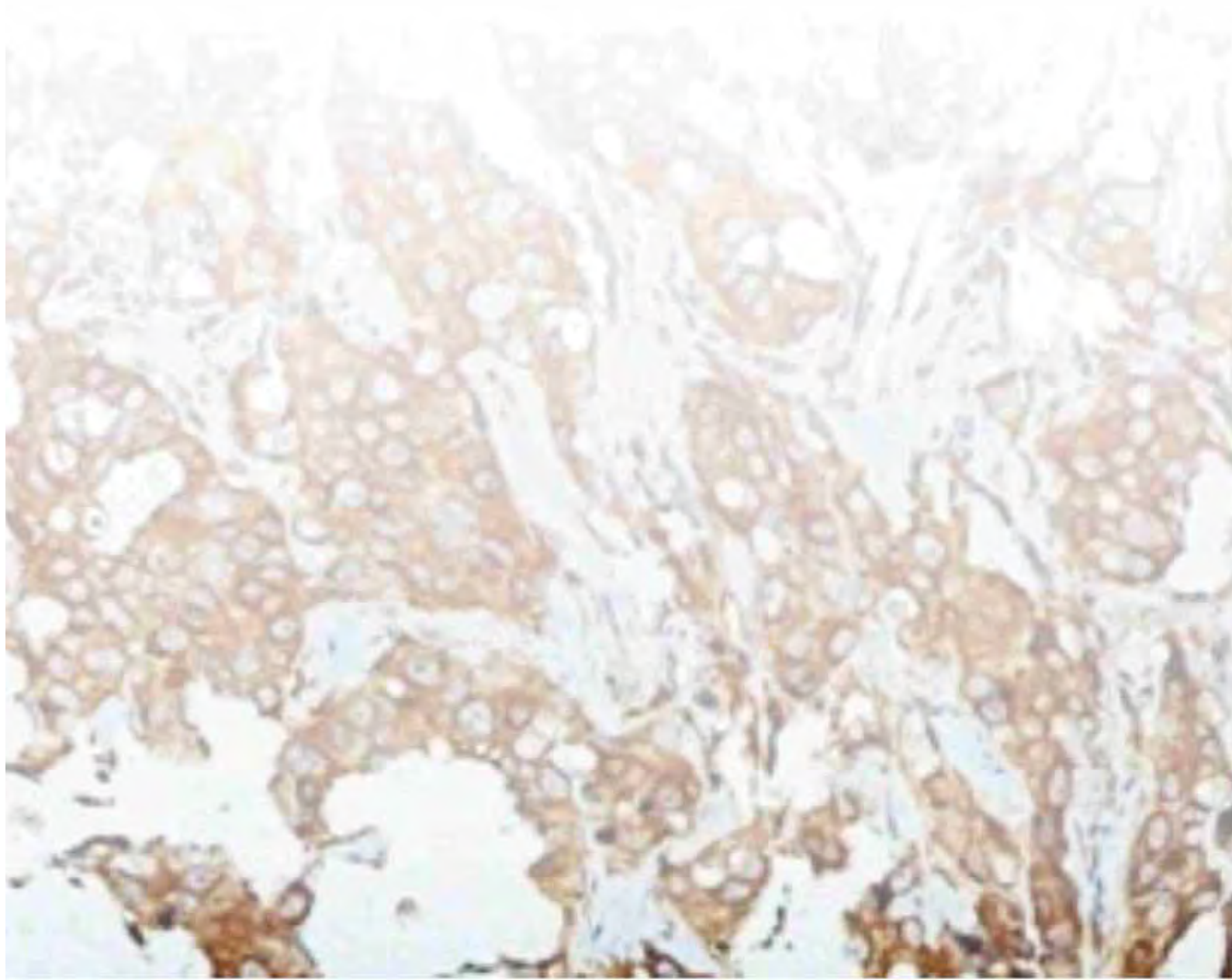


2. Considerando-se que:

1. O CM ocupa o primeiro lugar em incidência entre as mulheres no Brasil e no mundo (McPherson *et al.*,2000, Ozbas *et al.*, 2003; Ministério da Saúde, 2009);
2. Os marcadores prognósticos estabelecidos não conseguem prever a evolução da totalidade das pacientes com CM;
3. Não existem ainda marcadores preditivos estabelecidos de resposta à quimioterapia para uso na prática clínica oncológica;
4. O TGF- β tem funções distintas de acordo com a célula onde atua (epitélio *versus* estroma) e também em relação ao momento do tumor no *continuum* do processo de carcinogênese (precoce *versus* tardio);
5. O impacto prognóstico das proteínas TGF- β 1 e TGF- β RII ainda é indefinido, com resultados discordantes na literatura;
6. Pouco se sabe sobre o papel preditor de resposta à quimioterapia do TGF- β 1 e TGF- β RII;

Desta maneira, nós nos propomos a avaliar a expressão das proteínas TGF- β 1 e TGF- β RII, em amostras de carcinomas mamários invasivos submetidos ao TQN. Escolhemos estudar tumores localmente avançados, com estadiamento homogêneo (todos em estágio TNM III), com intuito de evitar o viés de estudar tumores em estadiamentos muito distintos e com diferentes atuações do TGF- β . O modelo de neoadjuvância é ideal para estudos que avaliam marcadores preditores de resposta à quimioterapia. Acreditamos que a expressão das proteínas TGF- β 1 e TGF- β RII seja capaz de separar grupos de pacientes com evoluções distintas (marcadores prognósticos) e possivelmente também diferentes sensibilidades a quimioterapia.

Objetivos



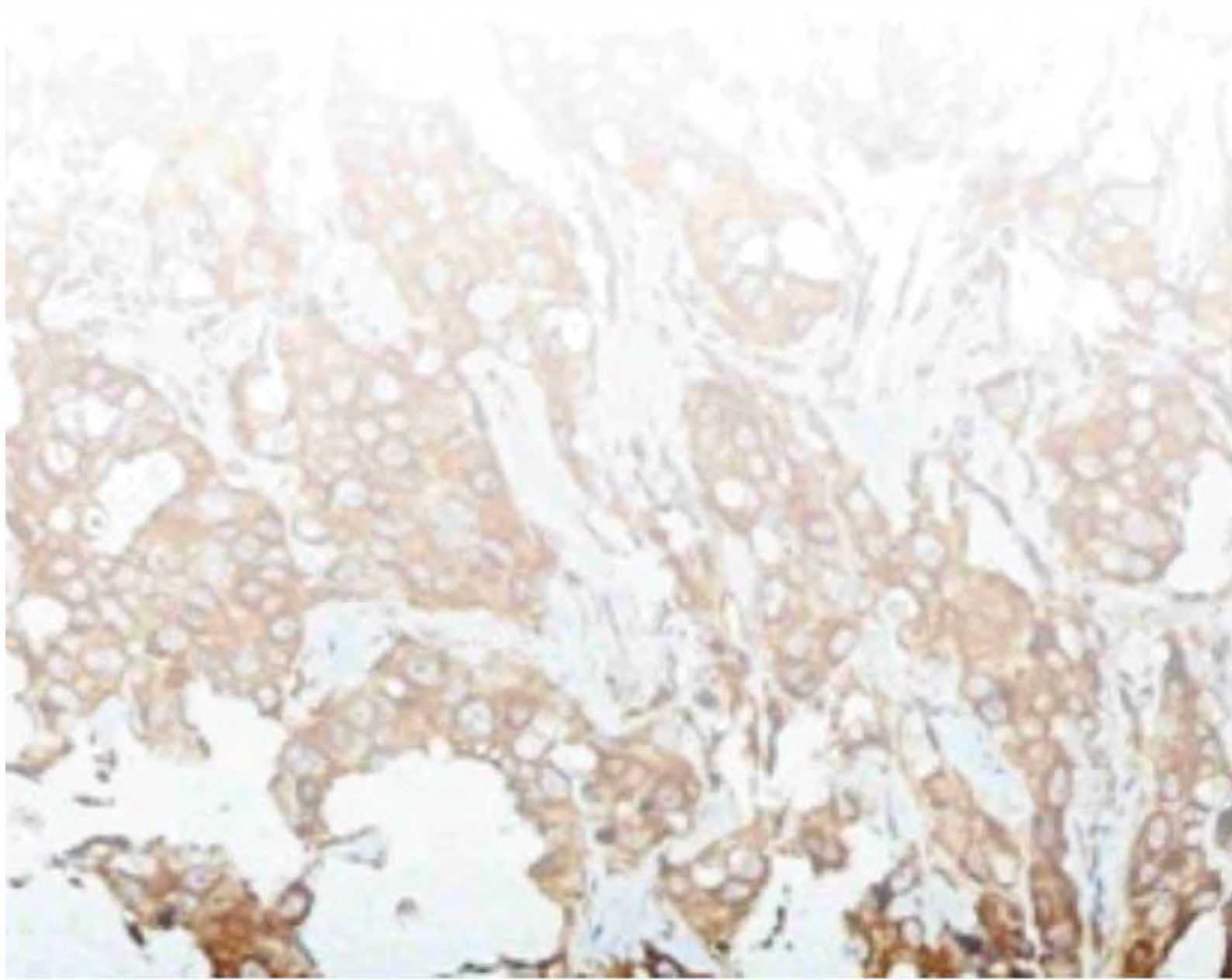
3.1- Objetivo Geral

- Avaliar, por imuno-histoquímica, a expressão das proteínas TGF- β 1 e TGF β -RII em amostras de carcinomas mamários invasivos, localmente avançados ao diagnóstico, submetidos a QtNeo baseada em doxorrubicina.

3.2- Objetivos Específicos

- Avaliar a associação das proteínas TGF- β 1 e TGF- β RII, por imuno-histoquímica, nas células epiteliais neoplásicas, com características clínicas, patológicas e ocorrência de metástase à distância e/ou recorrência local.
 - Comparar a expressão das proteínas TGF- β 1 e TGF- β RII, por imuno-histoquímica, nas células epiteliais neoplásicas, com as taxas de resposta completa, tanto clínica quanto patológica.
 - Avaliar a associação entre os sítios de metástase à distância (pulmão, osso, fígado e sistema nervoso central) com a expressão das proteínas TGF- β 1 e TGF- β RII;
 - Avaliar a SLD e a SG em função dos marcadores prognósticos clássicos e dos possíveis marcadores TGF- β 1 e TGF β -RII;
-

Referências



Aebi S, Davidson T, Gruber G, Castiglione M. On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010; 21 Suppl 5:v9-14.

Albain KS, Unger JM, Crowley JJ, Coltman Jr CA, Hershman DL. Racial disparities in cancer survival among randomized clinical trials patients of the Southwest Oncology Group. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(14):984-92.

Asiedu MK, Ingle JN, Behrens MD, Radisky DC, Knutson KL. TGF β /TNF α -mediated epithelial–mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer Res.* 2011;71(13):4707-19.

Banerjee S, Smith IE. Management of small HER2-positive breast cancers. *Lancet Oncol.* 2010;11(12):1193-9.

Benson JR. Role of transforming growth factor beta in breast carcinogenesis. *Lancet Oncol.* 2004;5:229-39.

Boccardo F, Rubagotti A, Puntoni M, Guglielmini P, Amoroso D, Fini A, et al. Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer: preliminary results of the Italian Tamoxifen Anastrozole trial. *J Clin Oncol.* 2005;23:5138-47.

Bonadonna G, Valagussa P, Rossi A, Tancini G, Brambilla C, Zambetti M, et al. Ten-year experience with CMF-based adjuvant chemotherapy in resectable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1985;5:95-115.

Böttinger EP, Jakubczak JL, Haines DC, Bagnall K, Wakefield LM. Transgenic mice overexpressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor beta receptor show enhanced tumorigenesis in the mammary gland and lung in response to the carcinogen 7,12-dimethylbenz-[a]-anthracene. *Cancer Res.* 1997;57:5564-70.

Bozzetti C, Musolino A, Camisa R, Flora M, Bassano C, Martella E, et al. Evaluation of HER-2/neu amplification and other biological markers as predictors of response to neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy in primary breast cancer: the role of anthracycline dose intensity. *Am J Clin Oncol.* 2006;29:171-7.

Buck MB, Fritz P, Dippon J, Zugmaier G, Knabbe C. Prognostic significance of transforming growth factor beta receptor II in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10:491-8.

Budzar AU, Valero V, Ibrahim NK, Francis D, Broglio KR, Theriault RL, et al. Neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy and concurrent trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2 – positive operable breast cancer: an update of the initial randomized study population and data of additional patients treated with the same regimen. *Clin Cancer Res.* 2007;13:228-33.

Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist.* 2004;9:606-16.

-
- Ciftci K, Su J, Trovitch PB. Growth factors and chemotherapeutic modulation of breast cancer cells. *J Pharm Pharmacol*. 2003;55(8):1135-41.
- Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, et al. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;366:2087-106.
- Coates AS, Keshaviah A, Thurlimann B, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, et al. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol*. 2007;25:486-92.
- Colleoni M, Viale G, Zariw D, Pruneri G, Gentilini, O, Veronesi P, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6622-8.
- Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, et al. Intergroup Exemestane Study. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;350:1081-92.
- Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, Fountzilas G, Murray S. Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist*. 2008;13:620-30.
- De Laurentiis M, Cancellato G, D'Agostino D, Giuliano M, Giordano A, Montagna E, et al. Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol*. 2008;26:44-53.
- De Lena, Zucali R, Viganotti G, Valagussa P, Bonadonna G. Combined chemotherapy-radiotherapy approach in locally advanced (T3b-T4) breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1978;1:53-9.
- Desruisseau S, Palmari J, Giusti C, Romain S, Martin PM, Berthois Y. Determination of TGFbeta1 protein level in human primary breast cancers and its relationship with survival. *Br J Cancer*. 2006;94(2):239-46.
- Dhesy-Thind B, Pritchard KI, Messersmith H, O'Malley F, Elavathil L, Trudeau M. HER2/neu in systemic therapy for women with breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109:209-29.
- Di Leo A, Tanner M, Desmedt C, Paesmans M, Cardoso F, Dubecq V, et al. P-53 gene mutations as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated with doxorubicin or docetaxel in the context of a phase III clinical trial. *Ann Oncol*. 2007;18:997-1003.
-

Dimri G, Band H, Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Res.* 2005;7(4):171-9.

Duebecq V, Paesmans M, Cardoso M, Desmedt C, Di Leo A, Chan S, et al. Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. *Mol Cancer Ther.* 2004;3:1207-14.

Dumont N, Arteaga CL. Transforming growth factor-beta and breast cancer tumor promoting effects of transforming growth factor-beta. *Breast Cancer Res.* 2000;2:125-32.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;365:1687-717.

Eiermann W, Paepke S, Appfelstaedt J, Llombart-Cussac A, Eremin J, Vinholes J, et al. Preoperative treatment of postmenopausal breast cancer patients with letrozole: a randomised double-blind multicenter study. *Ann Oncol.* 2001;12:1527-32.

Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:2078-93.

Ellis P, Barrett-Lee P, Johnson L, Cameron D, Wardley A, O'Reilly S, et al. Sequential docetaxel as adjuvant chemotherapy for early breast cancer (TACT): an open-label, phase III, randomized controlled trial. *Lancet.* 2009;373:1681-92.

Fleisch MC, Maxwell CA, Barcellos-Hoff MH. The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13:379-400.

Filyak Y, Filyak O, Stoika R. Transforming growth factor beta-1 enhances cytotoxic effect of doxorubicin in human lung adenocarcinoma cells of A549 line. *Cell Biol Int.* 2007;31:851-5.

Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(16):1233-41.

Galmarini CM, Treilleux I, Cardoso F, Bernard-Marty C, Durbecq V, Gancberg D, et al. Class III beta-tubulin isotype predicts response in advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or docetaxel. *Clin Cancer Res.* 2008;14:4511-6.

Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, Puntoni M, Colozza M, Pfeffer U, et al. HER-2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:14-20.

Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Porta VG, Semiglazov V, Lluch A, et al. Phase III trial evaluating the addition of paclitaxel to doxorubicin followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil, as adjuvant or primary systemic therapy: European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:2474-81.

Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandin S, et al. Neoadjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer: primary efficacy analysis of the NOAH trial. *Cancer Res.* 2009;69(2 Suppl):abstract 31.(b)

Gobbi H, Arteaga CL, Jensen RA, Simpson JF, Dupont WD, Olson SJ, et al. Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumour grade in human breast in-situ and invasive carcinomas. *Histopathology.* 2000;36:168-77.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011 Jun 27. [Epub ahead of print].

Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA. Immunohistochemical staining for transforming growth factor 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res.* 1992;52:6949-52.

Gorska AE, Jensen RA, Shyr Y, Aakre ME, Bhowmick NA, Moses HL. Transgenic mice expressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor-h receptor exhibit impaired mammary development and enhanced mammary tumor formation. *Am J Pathol.* 2003;163:1539-49.

Gorska AE, Joseph H, Derynck R, Moses HL, Serra R. Dominant-negative interference of the transforming growth factor h type II receptor in mammary gland epithelium results in alveolar hyperplasia and differentiation in virgin mice. *Cell Growth Differ.* 1998;9:229-38.

Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med.* 2003;349:1793-802.

Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, et al. Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCICCTG MA.17. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1262-71.

Halsted WS. The results of operations for cure of cancer of the breast performed at the John Hopkins Hospital from June 1889 to January 1894. *Ann Surg.* 1894-1895;20(5):297-350.

Henderson IC, Berry D, Demetri G, Cirrincione C, Goldstein L, Martino S, et al. Improved disease-free (DFS) and overall survival (OS) from the addition of sequential

paclitaxel (T) but not from the escalation of doxorubicin (A) dose level in the adjuvant chemotherapy of patients (pts) with node-positive primary breast cancer (BC) [Abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 1998;17:390A.

Hinshelwood RA, Huschtscha LI, Melki J, Stirzaker C, Abdipranoto A, Vissel B, et al. Concordant Epigenetic Silencing of Transforming Growth Factor-B Signaling Pathway Genes Occurs Early in Breast Carcinogenesis. *Cancer Res*. 2007;67:11517-27.

Inman GJ. Switching TGF β from a tumor suppressor to a tumor promoter. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(1):93-9.

Işeri OD, Kars MD, Arpacı F, Atalay C, Pak I, Gündüz U. Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern. *Biomed Pharmacother*. 2011;65(1):40-5.

Jakesz R, Jonat W, Gnant M, Mittlboeck M, Greil R, Tausch C, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet*. 2005;366:455-62.

Jakesz R, Greil R, Gnant M, Schmid M, Kwasny W, Kubista E, et al. Extended adjuvant therapy with anastrozole among postmenopausal breast cancer patients: results from the randomized Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 6a. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99:1845-53.

Jakowlew SB. Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25:435-57.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60:277-300.

Jones AL, Powles TJ, Law M, Tidy A, Easton D, Coombes RC, et al. Adjuvant aminoglutethimide for postmenopausal patients with primary breast cancer: analysis at 8 years. *J Clin Oncol*. 1992;10:1547-52.

Jones SE, Seynaeve C, Hasenburg A, et al. Results of the first planned analysis of the TEAM (tamoxifen exemestane adjuvant multinational) prospective randomized phase III trial in hormone sensitive postmenopausal early breast cancer. *Cancer Res* 2009; 69 Suppl 2:67s.

Josefsson ML, Leinster SJ. Aromatase inhibitors versus tamoxifen as adjuvant hormonal therapy for oestrogen sensitive early breast cancer in post-menopausal women: Meta-analyses of monotherapy, sequenced therapy and extended therapy. *Breast*. 2010; 19:76-83.

Kanamoto T, Hellman U, Heldin CH, Souchelnytskyi S. Functional proteomics of transforming growth factor-beta1-stimulated Mv1Lu epithelial cells: Rad51 as a target of TGFbeta1-dependent regulation of DNA repair. *EMBO J*. 2002;21:1219-30.

-
- Kim SII, Sohn J, Koo JS, Park SH, Park HS, Park BW. Molecular subtypes and tumor response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer. *Oncology*. 2010;79:324-30.
- Koumoundourou D, Kassimatis T, Zolota V, Tzorakoeleftherakis E, Ravazoula P, Vassiliou V, et al. Prognostic significance of TGFbeta-1 and pSmad2/3 in breast cancer patients with T1-2,N0 tumours. *Anticancer Res*. 2007;27:2613-20.
- Koutsilieris M, Reyes-Moreno C, Choki I, Sourla A, Doillon C, Pavlidis N. Chemotherapy cytotoxicity of human MCF-7 and MDA-MB 231 breast cancer cells is altered by osteoblast-derived growth factors. *Mol Med*. 1999;5:86-97.
- Lester SC. A Mama. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster JC. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. Cap. 23; p. 1074-103.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AL, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146.
- Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:1275-81.
- Loibl S, von Minckwitz G, Raab G, Blohmer JU, Dan Costa S, Gerber B, et al. Prospective central assessment of HER-2 status by FISH is not a predictive factor for pathologic complete response (pCR) in 648 breast cancer patients treated preoperatively with an anthracycline/taxane based regimen in the multicenter GeparTrio trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;94:S46.
- Lonning E. Study of suboptimum treatment response: lessons from breast cancer. *Lancet Oncol*. 2003;4:177-85.
- Mabry H, Giuliano AE. Sentinel node mapping for breast cancer: progress to date and prospects for the future. *Surg Oncol Clin North Am*. 2007;16(1):55.
- Madden JL. Modified radical mastectomy. *Surg Gynecol Obstet*. 1965;121(6):1221-30.
- Mamounas EP, Bryant J, Lembersky B, Fehrenbacher L, Sedlacek SM, Fisher B, et al. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *J Clin Oncol*. 2005;23:3686-96.
- Mamounas EP, Jeong JH, Wickerham DL, Smith RE, Ganz PA, Land SR, et al. Benefit from exemestane as extended adjuvant therapy after 5 years of adjuvant tamoxifen: intention-to-treat analysis of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-33 trial. *J Clin Oncol*. 2008;26:1965-71.
-

- Marrogi AJ, Munshi A, Merogi AJ, Ohadike Y, El-Habashi A, Marrogi OL, et al. Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma. *Int J Cancer*. 1997;74(5):492-501.
- Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla JP, Weaver C, et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;352:2302-13.
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Br Med J*. 2000;321:624-8.
- Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol*. 2011;223(2):205-18.
- Ministério da Saúde. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Brasília: INCA; 2009 [cited 2010 feb 25]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>.
- Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci*. 2003;94:230-4.
- Moreno-Aspitia A. Neoadjuvant therapy in early-stage breast cancer. *Crit Rev Oncol*. 2011. [Epub ahead of printing].
- Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res*. 1981;41:2842-8.
- Mouridsen H, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Thürlimann B, Paridaens R, Smith I, et al. Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:766-76.
- Muraoka-Cook RS, Dumont N, Arteaga CL. Dual role of transforming growth factor b in mammary tumorigenesis and metastatic progression. *Clin Cancer Res*. 2005;11:937-43.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367-74.
- Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 May 12. [Epub ahead of print]
- Ozbas S, Dafydd H, Purushotham AD. Bone marrow micrometastasis in breast cancer. *Br J Surg*. 2003;90:290-301.
- Paiva CE, Drigo SA, Rosa FE, Moraes Neto FA, Caldeira JR, Soares FA, et al. Absence of transforming growth factor-beta type II receptor is associated with poorer prognosis in HER2-negative breast tumours. *Ann Oncol*. 2010;21(4):734-40.
-

-
- Pantel K, Woelfle U. Cancer micrometastasis: detection, clinical relevance, and molecular description. In: Perry MC, editors. American Society of Clinical Oncology Educational Book. Alexandria: VA; 2004. p.701-8.
- Patey DH, Dyson WH. The prognosis of carcinoma of the breast in relation to the type of operation performed. *Br J Cancer*. 1948;2(3):7-13.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature (London)*. 2000;406:747-52.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R68.
- Rajkumar T, Samson M, Rama R, Sridevi V, Mahji U, Swaminathan R, et al. TGFbeta1 (Leu10Pro), p53 (Arg72Pro) can predict for increased risk for breast cancer in south Indian women and TGFbeta1 Pro (Leu10Pro) allele predicts response to neo-adjuvant chemo-radiotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;112:81-7.
- Rastelli F, Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori*. 2008;94:370-83.
- Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Pro- tocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. 2008;26:778-85.
- Ring AE, Smith IE, Ashley S, Fulford LG, Lakhani SR. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:2012-7.
- Robinson JO. Treatment of breast cancer through the ages. *Am J Surg*. 1986;151:317-33.
- Rody A, Karn T, Gätje R, Ahr A, Solbach C, Kourtis K, et al. Gene expression profiling of breast cancer patients treated with docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide within the GEPARTRIO trial: HER-2, but not topoisomerase II alpha and microtubule-associated protein tau, is highly predictive of tumor response. *Breast*. 2007;16:86-93.
- Sikov WM, Dizon DS, Strenger R, Legare RD, Theall KP, Graves TA, et al. Frequent pathologic complete responses in aggressive stages II to III breast cancers with every-4- week carboplatin and weekly paclitaxel with or without trastuzumab: a Brown University Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2009;27:4693-700.
- Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Blohmer JU, et al. Neoadjuvant treatment of post- menopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol*. 2005;23:5108-16.
-

- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.
- Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10393.
- Tan SM, Cheung KL, Willsher PC, Blamey RW, Chan SY, Robertson JF. Locally advanced primary breast tumour: medium-term results of a randomized controlled trial of multimodal therapy versus initial hormone therapy. *Eur J Cancer*. 2001;37:2331-8.
- Tang B, Böttinger EP, Jakowlew SB, Bagnall KM, Mariano J, Anver MR, et al. Transforming growth factor-beta1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat Med*. 1998;4(7):802-7.
- Tewari M, Krishnamurthy A, Shukla HS. Predictive markers of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Surg Oncol*. 2008;17:301-11.
- Thuerigen O, Schneeweiss A, Toedt G, Warnat P, Hahn M, Kramer H, et al. Gene expression signature predicting pathologic complete response with gemcitabine, epirubicin, and docetaxel in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:1839-45.
- Tian M, Neil JR, Schiemann WP. Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. *Cell Signal*. 2011;23(6):951-62.
- Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(16):1227-32.
- Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1684.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:719-26.
- von Minckwitz G, Müller BM, Loibl S, Budczies J, Hanusch C, Darb-Esfahani S, et al. Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2150-7.
- Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17:R245-62.
-

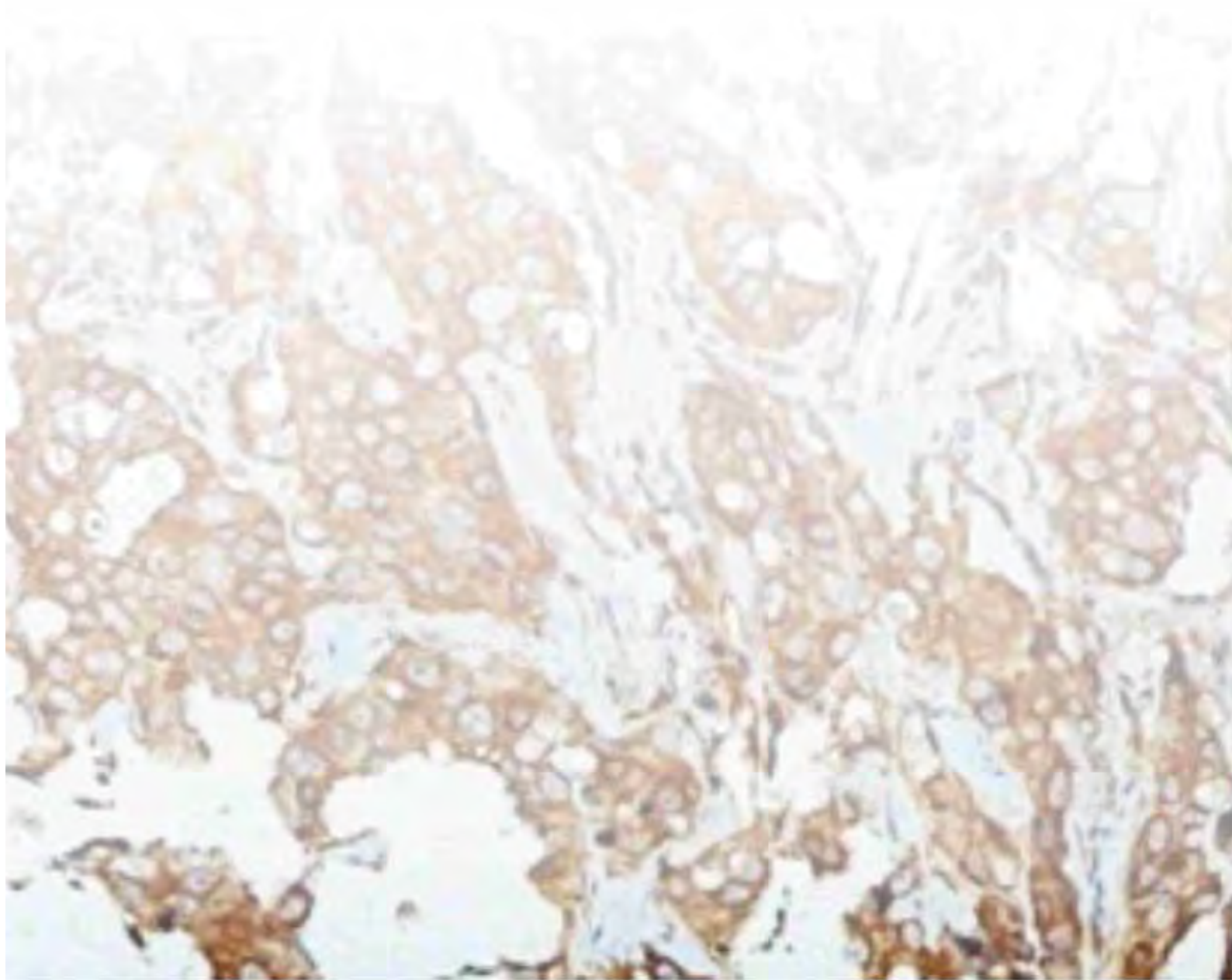
Wendt MK, Tian M, Schiemann WP. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF- β -induced EMT during cancer progression. *Cell Tissue Res.* 2011 Jun 21. [Epub ahead of print];

Woelfle U, Cloos J, Sauter G, Riethdorf L, Janicke F, van Diest P, et al. Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res.* 2003;63:5679-84.

Zhou L, Jiang Y, Yan T, Di G, Shen Z, Shao Z, et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(3):795-801.

Manuscrito *

* Manuscrito segundo as normas do periódico Cancer Investigation (ISSN: 0735-7907 - print, 1532-4192-electronic), Fator de Impacto: 2.39 (Journal citation reports® 2010, Thomson Scientific)



Absence of TGF- β RII predicts bone and lung metastasis and is associated with poor prognosis in TNM stage III breast tumors

Carlos Eduardo Paiva ^{1*}, Bianca Sakamoto Ribeiro Paiva ², Cristovam Scapulatempo ³, Fernando Augusto Soares ⁴, Silvia Regina Rogatto ⁵, Mariângela Esther Alencar Marques ⁶.

¹ Department of Clinical Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

² Barretos Cancer Hospital, Teaching and Research Institute, Barretos, São Paulo, Brazil

² NeoGene Laboratory, Department of Urology, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil, and A. C. Camargo Cancer Treatment and Research Center, São Paulo, Brazil

³ Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Pathology, A. C. Camargo Cancer Treatment and Research Center, Sao Paulo, Brazil.

⁶ Department of Pathology, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil

*Corresponding author:

Carlos Eduardo Paiva

Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos – Departamento de Oncologia Clínica.

Rua Antenor Duarte Villela, 1331, Bairro Dr. Paulo Prata, Barretos-SP, Brazil, CEP: 14784-400

Phone: 55 17 33216600. E-mail: caredupai@gmail.com.

Running title: TGF- β RII predicts poor prognosis in breast tumors

Keywords: breast cancer, survival, TGF- β R1, TGF- β RII.

Abstract

No research evaluating the expression of TGF- β 1 and TGF- β RII in human breast cancer (BC) samples as predictive markers of chemotherapy response has been published. The literature on their role as prognostic markers shows divergent results. Here, they were evaluated by means of immunohistochemistry on a tissue microarray of 110 TNM stage III BC samples subjected to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. Our results clearly demonstrate that neither of these markers predicts the response to neoadjuvant chemotherapy. They also indicate that TGF- β RII-negative tumor cells present higher risk of metastasis to lungs and bones, but not to the liver and central nervous system. TGF- β RII negativity was an independent prognostic factor for disease-free and overall survival.

Introduction

Breast cancer (BC) is a major health problem worldwide, with approximately 1,400,000 new cases diagnosed and 460,000 deaths secondary to the disease [1]. Survival rates are improving, possibly explained by better prevention strategies and inclusion of modern therapies in the treatment armamentarium.

Cytotoxic chemotherapy is a key component in the treatment paradigm for non-metastatic BC cases. Among the general population, although the role of chemotherapy in improving survival rates is undisputed [2], two obvious questions emerge: (1) who needs adjuvant chemotherapy? and (2) which chemotherapy regimen should be used? Prognostic factors can help clinicians to decide when to submit BC patients to cancer chemotherapy, and predictive factors could help them to select regimens with a higher likelihood of tumor response [3]. Better understanding of known prognostic/predictive factors and searching for newer tumor markers could direct us towards a more personalized form of oncology practice, with higher cure rates and fewer futile treatments.

The relationship between estrogen receptor (ER) positivity and response to hormone therapy is well documented [4], as is the response of HER-2 positive BC cases to trastuzumab [5]. However, no clinically useful predictive factors for cancer chemotherapy in BC cases have been established [6].

It has been shown that transforming growth factor-beta (TGF- β) participates in normal mammary gland morphogenesis and growth. Some isoforms of TGF- β (1, 2 or 3) bind with high affinity to the transforming growth factor-beta type II receptor (TGF- β RII), which transactivates transforming growth factor-beta type I receptor (TGF- β RI), thus initiating the intracellular signaling pathway [7]. Decreased expression of TGF- β RII protein has been observed in BC tissues and is considered to be a mechanism in which malignant cells can circumvent the suppressive effects of TGF- β [8-10].

The published studies addressing the role of TGF- β in predicting responses to cancer chemotherapy have mainly been preclinical [11,12]. TGF- β is a major inducer of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast tumors. Indirect evidence suggests that BCs that have undergone EMT are resistant to cancer chemotherapy [13]. The pro-allele of TGF- β 1 (Leu10Pro) has been associated with increased secretion of TGF- β 1 in BC [14]. In addition, BC patients harboring genotype Pro/Pro have been found to present a 10 times higher chance of achieving a pathologically complete response (pCR) after neoadjuvant chemo-radiotherapy [15].

To our knowledge, no research conducted in order to evaluate the protein expression of TGF- β 1 and TGF- β RII in BC samples as predictive markers of chemotherapy response has been published. The literature on their role as prognostic markers shows divergent results. TGF- β 1 protein expression has been associated both with better prognosis [10,16] and with poorer prognosis [17]. The same kind of controversy has been observed regarding TGF- β RII [10,18].

TGF- β plays a complex role in carcinogenesis, acting as a tumor suppressor early on and as a tumor promoter in later stages [7]. The exact mechanism that drives the switch from suppressor to promoter actions is at present unknown [19], yet this switch challenges the definition of the prognostic impact of this protein in BC cohorts. In this light, we decided to study a homogeneous cohort comprising only TNM stage III BC patients, with long follow-up, with the aim of evaluate the impact of TGF- β 1 and its receptor II in predicting the response to neoadjuvant doxorubicin-based chemotherapy. In addition, we aimed to determine the possible prognostic role of these markers in BC patients.

Material and Methods

Tissue samples and patient characteristics

Patients diagnosed and treated for TNM stage III BCs between September 1991 and March 2000 at the A.C. Camargo Cancer Hospital (São Paulo, Brazil), were included in this study. The inclusion criteria were: (1) histologically confirmed BC; (2) TNM clinical stage III; (3) doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy (NAC); and (4) any adjuvant chemotherapy. The exclusion criteria were: (1) inadequate tissue samples for TGF- β 1 and TGF- β R2 protein analysis; (2) lack of information regarding the initial treatment and its clinical response rate; (3) neoadjuvant treatment done at another hospital; and (4) inadequate staging. One hundred and ten stage III BC samples arranged in tissue microarrays were evaluated by means of immunohistochemistry. The tissue microarrays were constructed as previously described [20].

All the patients were initially treated with doxorubicin-based NAC. Seventy-eight patients (78/110; 71%) received the AC regimen (doxorubicin 60 mg/m² plus cyclophosphamide 600 mg/m², intravenously, every three weeks) and 32 (32/110; 29%) were treated with the AT regimen (doxorubicin 50 mg/m² plus paclitaxel 150 mg/m², intravenously, every three weeks). One hundred and two patients (102/110; 93%) and eight (8/110; 7%) received not more than three NAC cycles and more than three NAC cycles, respectively. All the patients were treated with adjuvant chemotherapy, as follows: 11 patients received the AC regimen (2-4 cycles) followed by a modified CMF regimen (cyclophosphamide 600 mg/m², methotrexate 40 mg/m² and 5-fluorouracil 600 mg/m², intravenously, every three weeks; 2-8 cycles), 71 received the AC regimen (2-4 cycles), 18 received the modified CMF regimen (2-8 cycles), nine received the AT regimen (3-5 cycles) and one received paclitaxel monotherapy (175 mg/m², intravenously, every three weeks; three cycles).

Regarding surgery, 106 patients (106/110; 96%) underwent modified radical mastectomy and four (4/110; 4%) underwent breast-conserving surgery. Both of these procedures included axillary lymph node dissection.

The median age of the patients investigated was 51 years (average 51.5 years; range 26-74 years); 53 (53/108; 49%) patients belonged to the premenopausal group and 55 (55/108; 51%) to the postmenopausal group. The median (standard deviation, SD) size (cm) of the primary tumors was 5.9 (3.0). Nineteen patients (19/110; 17%) were node-negative and 91 (91/110; 83%) were positive for lymph node metastasis. Eighty-seven (87/100; 87%) presented cT₁₋₃ stage and 13 (13/100, 13%) presented cT₄ stage. All the patients were classified as TNM clinical stage III. The histological gradings according to the Nottingham system were G1-2 (72/110; 65.5%) and G3 (38/110; 34.5%). ER, progesterone receptor (PgR) and HER-2 status were positive in 62 cases (62/104; 57%), 32 (32/107; 30%) and 16 (16/86; 19%), respectively.

The patients were followed prospectively with a mean follow-up of 81.8 ± 56.6 months (range 5.9-196 months). All the samples were from patients who had not been treated prior to surgery. The research project was approved by the local Institutional Review Board (protocol number 1436/10).

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical reactions were performed using the polyclonal rabbit antibody anti-TGF- β 1 RB-10347-P (Lab Vision, Fremont, CA, USA) (dilution 1:125) and the polyclonal rabbit antibody anti-TGF- β R2 RB-10345-P (Lab Vision, Fremont, CA, USA) (dilution 1:125). After 60 min of incubation, the sections were washed in PBS, incubated for 30 min with secondary biotinylated antibody, followed by incubation with streptavidin

peroxidase complex (LSAB, Dako, Carpinteria, CA, USA) for 30 min. The sections were developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and counterstained with HE.

Normal placental tissue was used as a positive control in each assay, to quantify the TGF- β 1 and TGF- β RII expression levels. TGF- β 1 and TGF- β RII were assessed using two negative controls (omitting the primary antibody and incubating the slides with PBS; and replacing the primary antibody with normal rabbit serum). The final scores were obtained according to the immunostaining intensity in epithelial cells and were designated as negative (score 0) or positive (score 1–3) (Figure 1). The analysis was carried out by two observers and the samples were scored blinded with regard to clinical patient data.

Response evaluation criteria

The clinical response was classified in accordance with the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) as progressive disease (PD), stable disease (SD), partial response (PR) or clinical complete response (cCR). Pathological responses were taken to be either complete (pCR) (absence of invasive residual cancer in breast and lymph nodes) or incomplete (any presence of invasive cancer in surgical specimen).

Statistical analysis

HER-2 status was considered to be positive (scores of 3+) or negative (scores of 0 or 1+); scores of 2+ were excluded from the analyses. The chi-square test or Fisher exact test was applied to determine the strength of association between the categorical variables.

A multivariate binary logistic regression model was used to examine the relationship between TGF- β 1 and TGF- β RII and complete response rates (yes vs. no) after adjusting for clinical factors that were expected to affect the response to NAC (age, cT, cN, histological grade, ER, PgR, taxane use and number of NAC cycles). The same kind of logistic regression

was performed in order to determine clinical-pathological variables that could predict specific metastasis sites (bone, lung, liver and central nervous system [CNS]). The variables included in the model were TGF- β 1, TGF- β RII, age, menopausal status, histological grade, ER, PgR and HER-2.

Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) probabilities were calculated using the Kaplan-Meier method. The end point for OS analysis was restricted to death due to BC and the end point for DFS analysis was a diagnosis of distant metastasis. Multivariate analysis was carried out using the Cox proportional hazards model. The following variables were included in the multivariate model according to their biological context relating to BC: age, ER, PgR, HER-2, histological grade, cT, cN, tamoxifen treatment and radiation treatment. The statistical analyses were carried out using GraphPad Prism3 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and SPSS version 15.0 (SPSS; Chicago, IL, USA) for Windows.

Results

TGF- β 1 and TGF- β RII protein expression in breast tumors and their association with clinical-pathological characteristics

TGF- β 1 protein exhibited cytoplasmic immunostaining and TGF- β RII protein analyses exhibited cytoplasmic and membranous immunostaining. Eighty-six cases (86/110; 78%) and 81 cases (81/110; 74%) were considered to be positive for TGF- β 1 and TGF- β RII, respectively.

No clinical-pathological characteristic was significantly correlated with TGF- β 1 and its receptor II (data not shown).

Clinical and pathological response rates according to TGF- β 1 and TGF- β RII protein expression

Five patients (5/110; 2.7 %) and 13 patients (13/110; 11.8%) presented pCR and cCR, respectively. Only five patients (5/110; 4.5%) had PD. No clinical-pathological characteristic was associated with occurrence of complete responses. In addition, neither TGF- β 1 nor TGF- β RII predicted complete responses (Table 1). Binary logistic regression analysis showed that no variable was independently associated with pCR occurrence. On the other hand, HER-2 protein expression (OR: 11.202; 95% CI: 1.7-73.4; $P = 0.012$) and tumors with positive regional lymph nodes (cN₁₋₃) (OR: 0.148; 95% CI: 0.023-0.963; $P = 0.046$) predicted occurrences of cCR after multivariate analysis.

Distant metastasis sites and their association with TGF- β 1 and TGF- β RII protein expression

In order to evaluate whether TGF- β 1 and TGF- β RII expression could be associated with distant dissemination to specific sites, cases with lung, bone, liver and CNS metastasis were analyzed separately. TGF- β 1 was not correlated with any metastasis site. On the other

hand, TGF- β RII-negative tumors showed higher risk of progression with lung metastasis during the follow-up (Table 2).

From multivariate regression model analysis, only TGF- β RII (OR = 0.180; 95% CI: 0.03-0.95; P = 0.044) and age (OR = 14.672; 95% CI: 1.41-151.75; P = 0.024) were associated with occurrences of bone metastasis. BCs expressing TGF- β RII (OR = 0.13; 95% CI: 0.03-0.64; P = 0.01) and ER (OR = 0.23; 95% CI: 0.05-0.92; P = 0.038) had a lower chance of dissemination to the lungs. Regarding liver and CNS metastasis, no significant associations were found from multivariate analysis.

Survival analyses according to TGF- β 1 and TGF- β RII protein expression

TGF- β 1 protein expression was not associated with disease recurrence (OR=1.05, 95% CI 0.32-3.35, P =1.00) or death (OR=1.07, 95% CI 0.33-3.43, P =1.00). On the other hand, TGF- β RII-negative BC presented higher risk of disease recurrence (OR=2.33, 95% CI 0.94-5.77, P =0.07) and death (OR=2.97, 95% CI 1.17-7.53, P =0.02).

Median OS was 88.7 months (95% CI 21.2-156.3). OS in 5 and 10 years were 59.3% and 47.6%, respectively. Table 3 describes univariate analysis of DFS and OS according to clinical-pathological variables. Marginally significant associations were observed between ER positivity (P =0.06), absence of lymph node dissemination (P =0.06) and longer OS. TGF- β 1 had no prognostic impact considering both DFS and OS analysis. On the other hand, TGF- β RII-negative BC presented poor DFS (Hazard rate [HR]: 1.65; 95% CI: 0.96-3.30; P = 0.06) and OS (HR: 1.73; 95% CI: 1.01-3.46; P = 0.04) (Figure 2 and Table 3).

Multivariate analysis demonstrated that TGF- β RII status was the only independent prognostic factor for DFS (HR: 2.123; 95% CI: 1.09-4.11; P = 0.026) and OS (HR: 2.11; 95% CI: 1.08-4.11; P = 0.028).

Discussion

TGF- β participates in normal mammary gland morphogenesis and growth. Spontaneous epithelial tumor formation was found to be greater in mice with mammary epithelium-specific expression of dominant negative TGF- β RII [21]. Loss of TGF- β RII expression in epithelial hyperplastic lesions lacking atypia has been associated with increased risk of subsequent invasive BC [22]. Down-expression of TGF- β RII in BCs has been well described and is considered to be a mechanism in which malignant cells can circumvent the suppressive effects of TGF- β [8-10].

In a preclinical study, exogenous TGF- β 1 partially neutralized the doxorubicin cytotoxicity in ER-negative BC cells (MDA-MB-231 cell line), but enhanced the doxorubicin blockade of ER-positive BC cells (MCF-7 cell line) at the G1/G0 phase [11]. Under higher concentrations, exogenous TGF- β 1 was capable of reducing the efficacy of doxorubicin cytotoxicity by promoting cell cycle arrest and consequent inhibition of proliferation [12]. The pro-allele of TGF- β 1 (Leu10Pro) has been associated with increased secretion of TGF- β 1 in BC cases [14]. In addition, BC patients harboring genotype Pro/Pro have been shown to have a 10 times higher chance of achieving pCR after neoadjuvant chemo-radiotherapy [15]. Recently, a cDNA microarray analysis was performed in order to identify gene expression patterns that could differentiate BC cells that were sensitive or resistant to cancer chemotherapy. Doxorubicin and taxane-resistant MCF-7 cells exhibited an epithelial-mesenchymal transition (EMT) gene expression pattern, particularly with higher TGF- β RII expression [13]. Based on the results from the literature, we hypothesized that TGF- β 1 and/or TGF- β RII-positive BCs would be resistant to chemotherapy. Our results clearly demonstrated that neither of these proteins are predictive factors for the response to NAC. To our knowledge, this is the first clinical study to evaluate their predictive values.

We found that absence of lymph node involvement and HER-2 positivity were associated with a higher chance of pCR, from evaluating a multivariate logistic regression model. *HER-2* gene is localized in chromosome 17, near *TOPO2A*. Some authors have argued that co-amplification would be the main reason explaining higher response rate to anthracyclines in HER-2 positive BCs [23]. It seems to us to be obvious that low TNM stage BCs should have greater likelihood of achieving a complete response. Regarding lymph nodes, a recently published article corroborates our finding [24].

TGF- β plays a complex role in carcinogenesis, acting as a tumor suppressor early on and as a tumor promoter in later stages [7]. Its role depends on the cell and tissue contexts. TGF- β acts as a potent tumor suppressor by inhibiting cell proliferation, inducing apoptosis, activating autophagia, inhibiting motility, promoting senescence and promoting differentiation. As a tumor promoter, it stimulates tumor progression by promoting proliferation, maintaining tumor stem cells, inducing EMT and inducing metastasis [19].

Successful metastatic colonization involves several biological processes. The invasion-metastasis cascade begins with local invasion, followed by intravasation into nearby blood and lymphatic vessels and escape from immune surveillance, then extravasation into a distal organ, formation of small cancer cell nodules (micrometastases), and finally establishment of metastatic colonies at a secondary organ site [25].

EMT is considered to be an essential process in the metastatic cascade [25]. TGF- β , implicated as the primary inducer of EMT, has been shown to prime BC cells for metastasis to the lung and bone, through effects on the cells in distant organ microenvironments [26, 27]. It has been shown that antimetastatic and prometastatic effects of TGF- β may exist simultaneously [28]. Development of aberrant cell survival signaling is required for each step of the metastatic process [29]. Bieri et al. [30] studied transgenic mouse models using an approach that completely ablates TGF- β RII expression and found that the loss of TGF- β

signaling significantly enhanced cancer cell survival (through reducing apoptosis and allowing tumor proliferation), and increased the lung metastasis rate. Our results indicate that TGF- β RII-negative tumor cells show higher risk of metastasis to lungs and bones, but not to the liver and CNS. We postulate that in TGF- β RII-negative BCs, resistance to TGF- β -mediated growth arrest is likely to be acquired and, importantly, the ability to exploit TGF- β signaling and induce pathways that promote pulmonary and bone metastasis is likely to be retained. On the other hand, primary tumor cells with high TGF- β RII protein expression would not be able to survive before and during the metastatic cascade.

Although several papers have linked overexpression of the TGF- β pathway with the EMT process and metastasis, clinical studies on human BCs have produced divergent results. In fact, EMT may occur in human BCs in a manner differing from what is seen in vitro [31]. Whereas the initial immunohistochemical studies showed that TGF- β 1 was a poorer prognostic marker in BC patients [17], recently published studies have indicated the opposite [10, 16]. The prognostic impact of TGF- β RII is also a source of controversy. While one published study found that ER-negative BC patients with absence of TGF- β RII protein expression showed increased survival rates [18], the findings from our previous study [10] suggested that absence of TGF- β RII is a poor prognostic marker in HER-2 negative BCs. In the present study, we did not find any prognostic impact from TGF- β 1 in our homogeneous cohort of stage III BC. On the other hand, TGF- β RII-negative BC cases had significantly lower DFS and OS, even after controlling for confounding factors.

In conclusion, our data indicate that TNM stage III BC with absence of TGF- β RII protein expression presents higher rates of lung and bone metastasis and poorer survival. Future clinical studies on BC patients using agents that inhibit TGF- β RII should be designed with caution, since the role of TGF- β RII in BC carcinogenesis is not completely understood yet. Confirmatory prospective studies with large number of patients are warranted.

References

1. Ferlay, J.; Shin, H.R.; Bray, F.; Forman, D.; Mathers, C.; Parkin, D.M. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
 2. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **2005**, *365*, 1687-1717.
 3. Weigel, M.T.; Dowsett, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer* **2010**, *17*, R245-262.
 4. Rastelli, F.; Crispino, S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori* **2008**, *94*, 370-383.
 5. Vogel, C.L.; Cobleigh, M.A.; Tripathy, D.; Gutheil, J.C.; Harris, L.N.; Fehrenbacher, L.; et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **2002**, *20*, 719-726.
 6. Duffy, M.J.; O'Donovan, N.; Crown, J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *Cancer Treat Rev* **2011**, *37*, 151-159.
 7. Ikushima, H.; Miyazono, K. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10*, 415-424.
-

8. Gobbi, H.; Arteaga, C.L.; Jensen, R.A.; Simpson, J.F.; Dupont, W.D.; Olson, S.J.; et al. Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumour grade in human breast in-situ and invasive carcinomas. *Histopathology* **2000**, *36*, 168-177.
9. Hinshelwood, R.A.; Huschtscha LI.; Melki J.; Stirzaker C.; Abdipranoto A.; Vissel B.; et al. Concordant epigenetic silencing of transforming growth factor-beta signaling pathway genes occurs early in breast carcinogenesis. *Cancer Res* **2007**, *67*, 11517-11527.
10. Paiva, C.E.; Drigo, S.A.; Rosa, F.E.; Moraes Neto, F.A.; Caldeira, J.R.; Soares, F.A.; et al. Absence of transforming growth factor-beta type II receptor is associated with poorer prognosis in HER2-negative breast tumours. *Ann Oncol* **2010**, *21*, 734-740.
11. Koutsilieris, M.; Reyes-Moreno, C.; Choki, I.; Sourla, A.; Doillon, C.; Pavlidis, N. Chemotherapy cytotoxicity of human MCF-7 and MDA-MB 231 breast cancer cells is altered by osteoblast-derived growth factors. *Mol Med* **1999**, *5*, 86-97.
12. Ciftci, K.; Su, J.; Trovitch, P.B. Growth factors and chemotherapeutic modulation of breast cancer cells. *J Pharm Pharmacol* **2003**, *55*, 1135-1141.
13. Iseri, O.D.; Kars, M.D.; Arpaci, F.; Atalay, C.; Pak, I.; Gündüz, U. Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern. *Biomed Pharmacother* **2011**, *65*:40-45.
-

14. Dunning, A.M.; Ellis, P.D.; McBride, S.; Kirschenlohr, H.L.; Healey, CS.; Kemp, P.R.; et al. A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res* **2003** , *63*, 2610–2615.
15. Rajkumar, T.; Samson, M.; Rama, R.; Sridevi, V.; Mahji, U.; Swaminathan, R.; et al. TGFbeta1 (Leu10Pro), p53 (Arg72Pro) can predict for increased risk for breast cancer in south Indian women and TGFbeta1 Pro (Leu10Pro) allele predicts response to neo-adjuvant chemo-radiotherapy. *Breast Cancer Res Treat* **2008**, *112*, 81-87.
16. Koumoundourou, D.; Kassimatis, T.; Zolota, V.; Tzorakoeleftherakis, E.; Ravazoula, P.; Vassiliou, V.; et al. Prognostic significance of TGFbeta-1 and pSmad2/3 in breast cancer patients with T1-2,N0 tumours. *Anticancer Res* **2007**, *27*, 2613-2620.
17. Gorsch, S.M.; Memoli, V.A.; Stukel, T.A.; Gold, L.I.; Arrick, B.A. Immunohistochemical staining for transforming growth factor 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* **1992**, *52*, 6949-6952.
18. Buck, M.B.; Fritz, P.; Dippon, J.; Zugmaier, G.; Knabbe, C. Prognostic significance of transforming growth factor beta receptor II in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **2004**, *10*, 491-498.
19. Inman GJ. Switching TGFβ from a tumor suppressor to a tumor promoter. *Curr Opin Genet Dev* **2011**, *21*, 93-99.
-

20. Nagai, M.A.; Fregnani, J.H.; Netto, M.M.; Brentani, M.M.; Soares, F.A. Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat* **2007**, *106*, 49–56.
21. Gorska, A.E.; Jensen, R.A.; Shyr, Y.; Aakre, M.E.; Bhowmick, N.A.; Moses, H.L. Transgenic mice expressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor-beta receptor exhibit impaired mammary development and enhanced mammary tumor formation. *Am J Pathol* **2003**, *163*, 1539-1549.
22. Gobbi, H.; Dupont, W.D.; Simpson, J.F.; Plummer, W.D. Jr.; Schuyler, P.A.; Olson, S.J.; et al. Transforming growth factor-beta and breast cancer risk in women with mammary epithelial hyperplasia. *J Natl Cancer Inst* **1999**, *91*, 2096.
23. Gennari, A.; Sormani, M.P.; Pronzato, P, Puntoni, M.; Colozza, M.; Pfeffer, U.; et al. HER-2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst* **2008**, *100*, 14-20.
24. Osako, T.; Horii, R.; Matsuura, M.; Ogiya, A.; Domoto, K.; Miyagi, Y.; et al. Common and discriminative clinicopathological features between breast cancers with pathological complete response or progressive disease in response to neoadjuvant chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* **2010**, *136*, 233-241.
25. Hanahan, D.; Weinberg, R.A.; Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
-

26. Padua, D.; Zhang, X.H.; Wang, Q.; Nadal, C.; Gerald, W.L.; Gomis, R.R.; et al. TGF- β primes breast tumours for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* **2008**, *133*, 66–77.
27. Yin, J.J.; Selander, K.; Chirgwin, J.M.; Dallas, M.; Grubbs, B.G.; Wieser, R.; et al. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* **1999**, *103*, 197-206.
28. Muraoka, R.S.; Koh, Y.; Roebuck, L.R.; Sanders, M.E.; Brantley-Sieders, D.; Gorska, A.E.; et al. Increased malignancy of Neu-induced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta1. *Mol Cell Biol* **2003**, *23*, 8691-8703.
29. Mehlen, P.; Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6*, 449-458.
30. Bierie, B.; Stover, D.G.; Abel, T.W.; Chytil, A.; Gorska, A.E.; Aakre, M.; et al. Transforming growth factor-beta regulates mammary carcinoma cell survival and interaction with the adjacent microenvironment. *Cancer Res* **2008**, *68*, 1809-1819.
31. Dubois-Marshall, S.; Thomas, J.S.; Faratian, D.; Harrison, DJ.; Katz, E. Two possible mechanisms of epithelial to mesenchymal transition in invasive ductal breast cancer. *Clin Exp Metastasis* **2011** Jul 26. [Epub ahead of print].
-

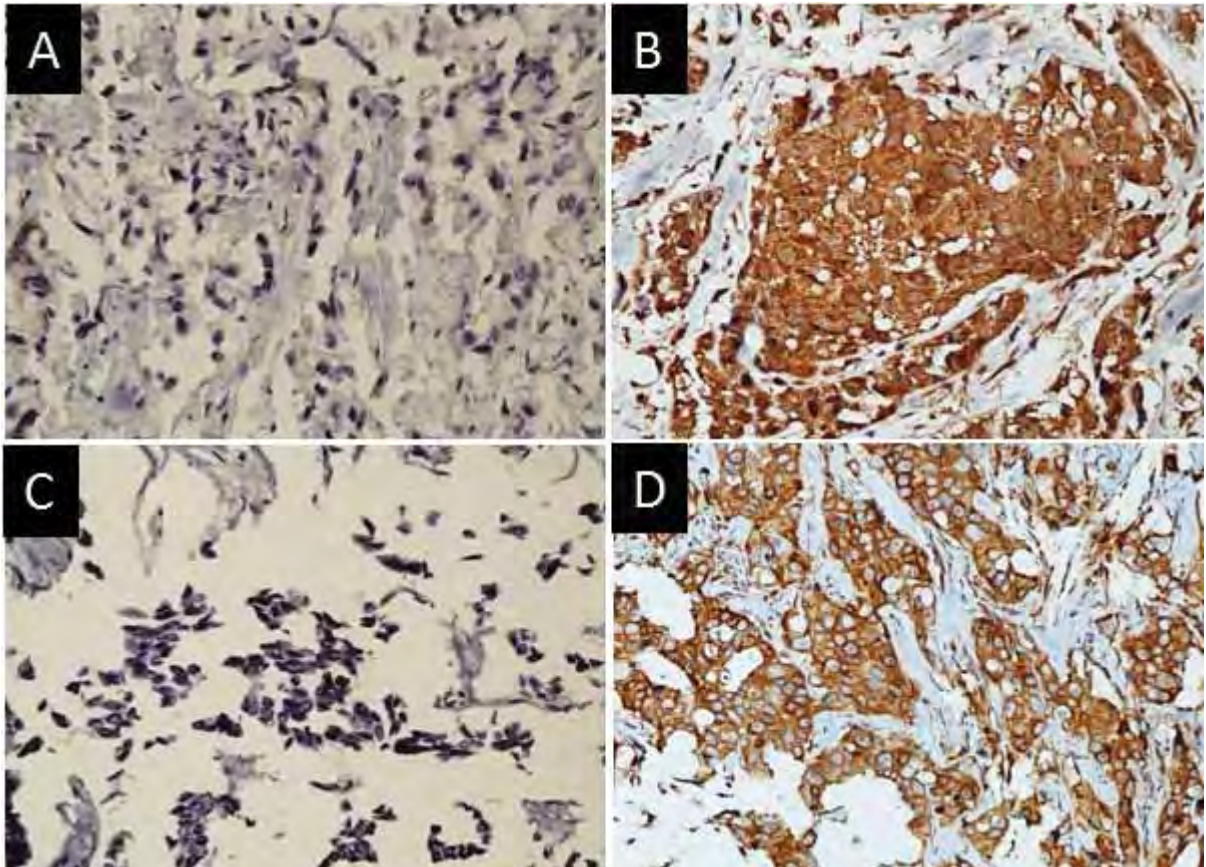


Figure 1. Representative examples of immunohistochemical staining for transforming growth factor-beta-1 (TGF- β 1) and transforming growth factor-beta type II receptor (TGF- β RII) in epithelial cells from breast cancer cases. Negative (A) and positive (B) staining for TGF- β 1. Negative (C) and positive (D) staining for TGF- β RII (original magnification x 400).

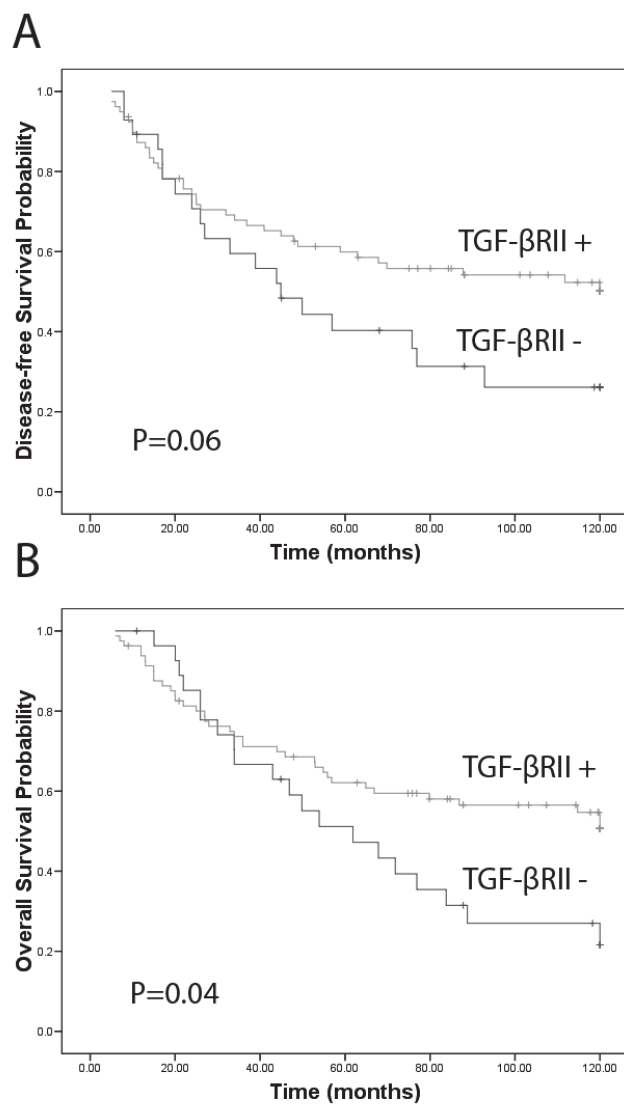


Figure 2. Disease-free survival (A) and overall survival (B) curves according to TGF- β RII protein expression in TNM stage III breast cancer patients. *P* values were determined by means of the log-rank test.

Table 1. Patient characteristics associated with pathological complete responses (pCR) and clinical complete responses (cCR) (n=110).

Characteristics	pCR		P	cCR		P
	Yes N (%)	No N (%)		Yes N (%)	No N (%)	
<i>Age (years)</i>			0.82			0.43
≤35	0 (0)	8 (100)		2 (25)	6 (75)	
35-60	3 (4)	66 (96)		7 (10)	64 (90)	
>60	1 (3)	29 (97)		4 (13)	26 (87)	
<i>Menopausal status</i>			0.61			0.55
Pre	1 (2)	50 (98)		5 (9)	48 (91)	
Post	3 (5)	52 (95)		8 (15)	47 (85)	
<i>ER</i>			1.00			0.76
Positive	2 (3)	59 (97)		7 (11)	55 (89)	
Negative	2 (5)	39 (95)		6 (14)	36 (86)	
<i>PgR</i>			0.58			0.52
Positive	2 (6)	30 (94)		5 (16)	27 (84)	
Negative	2 (3)	70 (97)		8 (11)	66 (89)	
<i>HER-2</i>			1.00			0.20
Positive	0 (0)	15 (100)		4 (25)	12 (75)	
Negative	4 (6)	64 (94)		7 (10)	62 (90)	
<i>Histological grading</i>			0.29			0.53
G1-2	4 (6)	67 (94)		10 (14)	62 (86)	
G3	0 (0)	36 (100)		3 (8)	34 (92)	
<i>Tumor size (cT)</i>			0.33			1.00
T ₁₋₃	1 (8)	11 (92)		1 (8)	12 (92)	
T ₄	2 (2)	83 (98)		11 (13)	75 (87)	
<i>Lymph node (cN)</i>			0.52			0.22
N ₀	1 (6)	17 (94)		4 (22)	14 (78)	
N ₁₋₃	3 (3)	86 (97)		9 (10)	82 (90)	
<i>AT regimen</i>			0.07			0.19
Yes	3 (10)	28 (90)		6 (19)	26 (81)	
No	1 (1)	75 (99)		7 (9)	70 (91)	
<i>Number of NAC cycles</i>			1.00			0.59
≤3	4 (4)	95 (96)		13 (13)	88 (87)	
>3	0 (0)	8 (100)		0 (0)	8 (100)	
<i>TGF-β1</i>			1.00			0.72
Positive	3 (4)	80 (96)		11 (13)	74 (87)	
Negative	1 (4)	23 (96)		2 (8)	22 (92)	
<i>TGF-βRII</i>			0.57			0.50
Positive	4 (5)	74 (95)		11 (14)	69 (86)	
Negative	0 (0)	29 (100)		2 (7)	27 (93)	

pCR, pathological complete response; cCR, clinical complete response; NAC, neoadjuvant chemotherapy; AT regimen, doxorubicin 50 mg/m² plus paclitaxel 150 mg/m², intravenously, every three weeks; HER2, human epidermal growth factor receptor-2; ER, estrogen receptor; PgR, progesterone receptor; TGF-β1, transforming growth factor-beta-1; TGF-βRII, transforming growth factor-beta type II receptor.

Table 2. Distant metastasis site and its association with TGF- β 1 e TGF- β RII proteins (n=101).

Metastasis site	n*	TGF- β 1		P	TGF- β RII		P
		Positive (%)	Negative (%)		Positive (%)	Negative (%)	
<i>Bone</i>				0.56			0.09
Yes	22	16 (73)	6 (27)		13 (59)	9 (41)	
No	79	63 (80)	16 (20)		62 (78)	17 (22)	
<i>Lung</i>				0.10			0.01
Yes	27	18 (67)	9 (33)		15 (56)	12 (44)	
No	74	61 (82)	13 (18)		60 (81)	14 (19)	
<i>Hepatic</i>				0.20			1.00
Yes	9	9 (100)	0 (0)		7 (78)	2 (22)	
No	92	70 (76)	22 (24)		68 (74)	24 (26)	
<i>CNS</i>				0.34			0.18
Yes	7	7 (100)	0 (0)		7 (100)	0 (0)	
No	94	72 (77)	22 (23)		26 (28)	68 (72)	

TGF- β 1, transforming growth factor-beta-1; TGF- β RII, transforming growth factor-beta type II receptor; CNS, central nervous system. *Nine patients presenting metastasis during follow-up were not analyzed because of lack of information regarding site of metastasis.

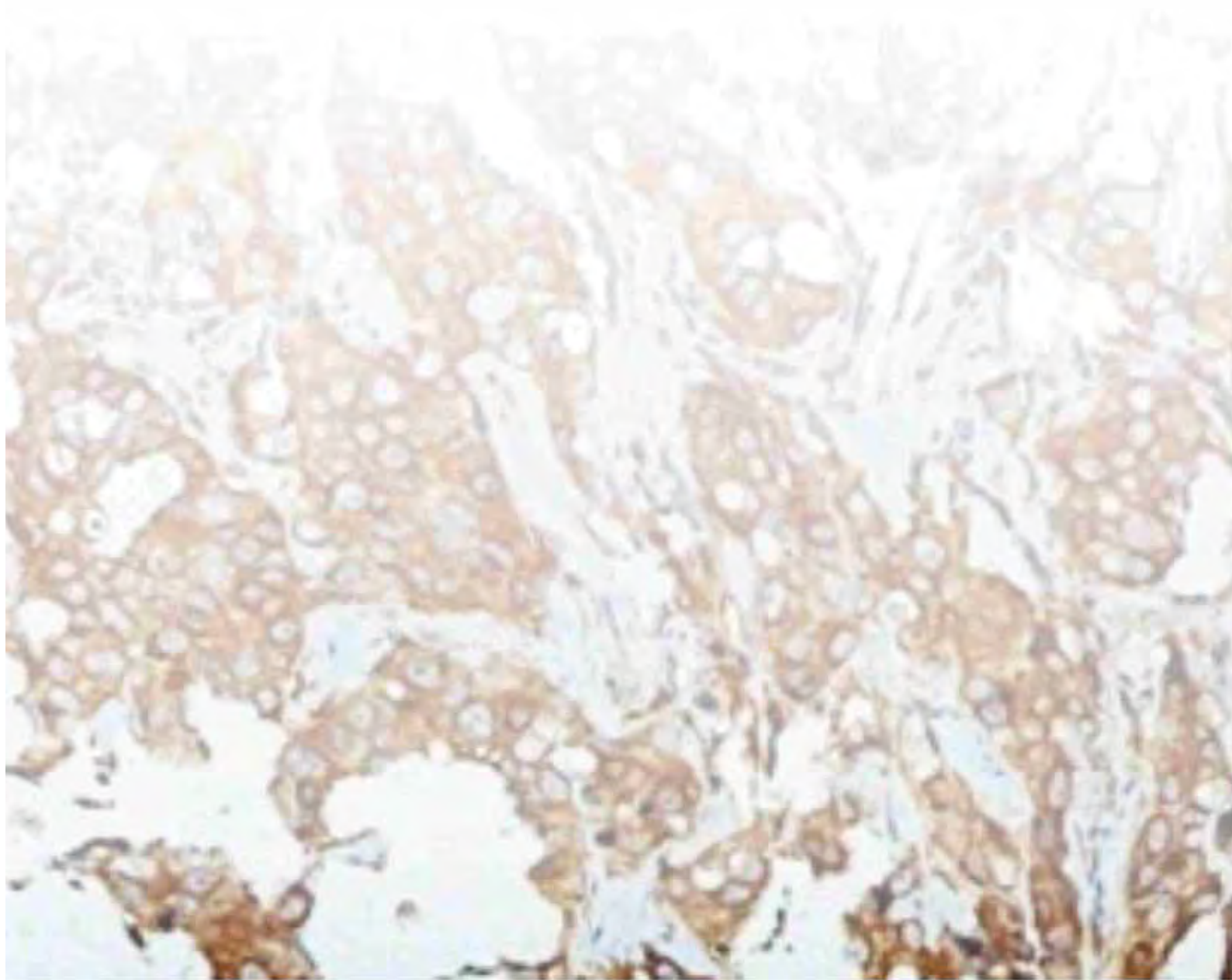
Table 3. DFS and OS analyses on stage III breast cancer patients (n = 110)

Variable	n	DFS		P	OS		P*
		5 years (%)	10 years (%)		5 years (%)	10 years (%)	
<i>Age (years)</i>				0.32			0.35
≤35	8	75.0	75.0		75.0	75.0	
35-60	72	52.4	42.9		57.9	43.0	
>60	29	55.0	42.8		58.2	50.4	
<i>Menopausal status</i>				0.25			0.30
Pre	53	48.8	39.3		57.6	40.4	
Post	54	61.3	52.6		61.6	55.0	
<i>ER</i>				0.15			0.06
Positive	61	58.8	51.4		66.2	52.9	
Negative	42	48.7	36.5		49.5	40.9	
<i>PgR</i>				0.15			0.12
Positive	32	63.9	56.3		73.6	58.0	
Negative	74	50.5	40.7		53.1	44.0	
<i>HER-2</i>				0.99			0.99
Positive	16	53.6	45.9		52.5	52.5	
Negative	69	54.5	42.1		61.8	46.1	
<i>Histological grading</i>				0.56			0.68
G1-2	71	57.7	48.7		61.5	48.2	
G3	38	50.0	40.9		55.3	46.5	
<i>Tumor size (cT)</i>				0.40			0.57
T ₁₋₃	13	56.3	44.5		61.4	47.6	
T ₄	86	58.3	58.3		61.5	53.8	
<i>Lymph node (cN)</i>				0.12			0.06
N ₀	19	65.4	65.4		70.8	70.8	
N ₁₋₃	90	52.7	42.2		57.0	43.6	
<i>Hormone therapy</i>				0.09			0.13
Yes	30	66.7	63.2		66.7	58.8	
No	78	50.0	38.9		56.5	43.2	
<i>Radiation therapy</i>				0.69			0.63
Yes	106	55.5	46.1		60.1	48.0	
No	3	33.3	33.3		33.3	33.3	
<i>TGF-β1</i>				0.98			0.98
Positive	86	54.6	47.3		56.7	48.4	
Negative	23	55.9	40.8		69.6	45.3	
<i>TGF-βRII</i>				0.06			0.04
Positive	81	59.9	52.3		62.1	54.7	
Negative	28	40.3	26.1		51.2	27.0	

P values obtained by means of the log-rank test.

DFS, disease-free survival; OS, overall survival; HER2, human epidermal growth factor receptor-2; TGF-β1, transforming growth factor-beta-1; TGF-βRII, transforming growth factor-beta type II receptor; ER, estrogen receptor; PgR, progesterone receptor.

Anexos



Anexo A

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 15 de Setembro de 2010.

À
Dra. Silvia Regina Rogatto


Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1436/10
“Avaliação dos marcadores TGF- β 1 e TGF- β RII em carcinomas mamários submetidos à quimioterapia neoadjuvante”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 10/08/2010, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Ciência do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1436/10

Título: "Avaliação dos marcadores TGF- β 1 e TGF- β RII em carcinomas mamários submetidos à quimioterapia neoadjuvante".

Pesquisador Responsável: Dra. Silvia Regina Rogatto

Co-Pesquisador(es): Dra. Mariângela Esther de Alencar Marques e Dr. Fernando Augusto Soares.

Aluno: Carlos Eduardo Paiva (Doutorado – UNESP)

Patrocinador: não há.

Comentários gerais:

Projeto ligado à tese de doutorado, com o intuito de investigar, por imunistoquímica, a expressão dos marcadores TGF- β 1 e TGF- β RII em carcinomas de mama submetidos à quimioterapia neoadjuvante, utilizando-se a técnica de Tissue Microarray (TMA), para avaliar seu potencial como preditores de resposta ao tratamento neoadjuvante.

Adequação do título: adequado.

Adequação da revisão de literatura: adequada.

Adequação dos objetivos frente à literatura: adequados.

Desenho e metodologia do projeto (grupos experimentais, procedimentos, indicadores de resultado, tipo de estudo, fase da pesquisa):

Serão avaliados retrospectivamente 160 casos de carcinomas mamários, diagnosticados pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, amostrados em bloco de TMA previamente confeccionado pelo Departamento para estudos anteriores. Os anticorpos anti-TGF- β 1 e anti-TGF- β RII fazem parte do acervo de anticorpos disponíveis no Departamento de Anatomia Patológica. A expressão das respectivas proteínas será comparada com as taxas de resposta clínica e patológica, dividindo-se os casos em tumores tipo RE e/ou RP (-)/HER2(+), RE e/ou RP (+)/HER2(-) e RE e/ou RP (-)/HER2(-). A expressão das proteínas será também comparada às características clínico-patológicas dos tumores e ocorrência de metástases locorregionais e à distância, de acordo com ficha padronizada de coleta de dados para cada caso avaliado.

Critérios de inclusão: Carcinomas mamários diagnosticados no Hospital A.C. Camargo, submetidos à quimioterapia neoadjuvante, representados em TMA previamente construído pelo serviço. Pacientes do sexo feminino em qualquer faixa etária.

Critérios de exclusão: Pacientes com carcinomas "in situ" ou microinvasores na biópsia inicial, com presença de metástases ao diagnóstico ou que não tenham sido adequadamente estadiadas. Pacientes com informações incompletas sobre o tratamento neoadjuvante administrado ou submetidas a tratamento hormonioterápico e radioterápico concomitante.

Riscos e benefícios aos sujeitos: Não há.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Solicitada dispensa de obtenção de TCLE, por se tratar de pesquisa retrospectiva.

Análise crítica de riscos: não se aplica.

Duração total da pesquisa: 12 meses.

Explicitação das responsabilidades:

- **do pesquisador:** de acordo com a Resolução CNS 196/96 e complementares. Foram apresentadas cartas de ciência dos respectivos colaboradores e departamentos envolvidos.
- **do patrocinador:** não se aplica.

Explicitação dos critérios para suspender ou encerrar a pesquisa: não se aplica.

Local de pesquisa: Hospital A.C. Camargo – Fundação Antônio Prudente.

Fonte financeira: não há (bloco de TMA previamente confeccionado e anticorpos previamente adquiridos para pesquisa anterior, não havendo custos para aquisição de material e reagentes).


Análise da Comissão de Pesquisa: Aprovado.

Comentários Finais:

O projeto está adequado, podendo levar à identificação de marcadores preditivos de quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama. O grupo de pesquisa possui a experiência necessária para condução do estudo.

Parecer Final:

Projeto Aprovado.


FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador



Recebido: *Paula*
FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital do Câncer A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Recebido: *Paula*

São Paulo, 15 de Setembro de 2011

Ao Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer – A.C. Camargo

Registro CEP nº: 1436/10

Nome do Projeto: Avaliação dos marcadores TGF- β 1 e TGF- β RII em carcinomas mamários submetidos à quimioterapia neoadjuvante

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Sílvia Regina Rogatto

Prezados Senhores,

Solicito mudança no título da pesquisa mencionada acima para: **"Avaliação dos marcadores TGF- β 1 e TGF- β RII em carcinomas mamários localmente avançados e sua associação com fatores clínico-patológicos"**.

O projeto é objeto de Tese de Doutorado do aluno de Carlos Eduardo Paiva (PG em Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP) com orientação da Profa. Dra. Mariângela Esther de Alencar Marques (Dep. Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP). A mudança no título foi sugerida por banca de qualificação realizada em 26/8/2011.

Atenciosamente,

Sílvia Regina Rogatto
Pesquisador Responsável pelo Projeto
Data: 12/9/2011

Anexo B

PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA TRATADAS COM QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" e Hospital do Câncer AC Camargo		
Número de registro no banco de dados _____ Iniciais do Nome _____		
Menopausa <input type="checkbox"/> Pré: <input type="checkbox"/> Pós <input type="checkbox"/> Indeterminado	Cor: <input type="checkbox"/> branca <input type="checkbox"/> negra <input type="checkbox"/> parda <input type="checkbox"/> _____	Idade ao diagnóstico: ___anos
Dados Clínicos ao diagnóstico		
Diagnóstico histopatológico: <input type="checkbox"/> Carcinoma ductal invasivo <input type="checkbox"/> Carcinoma lobular invasivo <input type="checkbox"/> _____		
Grau Nuclear <input type="checkbox"/> GN1 <input type="checkbox"/> GN2 <input type="checkbox"/> GN3 <input type="checkbox"/> NA		Grau histopatológico: <input type="checkbox"/> G1 <input type="checkbox"/> G2 <input type="checkbox"/> G3 <input type="checkbox"/> NA
Receptor de estrogênio <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/> NA	Receptor de progesterona <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/> NA	HER-2 <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1+ <input type="checkbox"/> 2+ <input type="checkbox"/> 3+ <input type="checkbox"/> NA
Estadiamento Clínico cT__N__M__ estadio _____		Estadiamento Patológico ypT__N__M__ estadio _____
Quimioterapia Neoadjuvante		
Data do início: ___/___/___		
1º Regime empregado (sigla) _____ nº de ciclos: _____		
2º Regime empregado (sigla) _____ nº de ciclos: _____		
<i>Diminuição de dose (>15%)</i> Número de ciclos com dose reduzida: _____		<i>Atraso de ciclos (≥ 1 semana)</i> Número de ciclos com atraso: _____
Resposta Clínica (RECIST) <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Estabilização <input type="checkbox"/> Progressão de doença		Resposta Patológica Grau patológico (GP) de Chevallier: <input type="checkbox"/> GP1 <input type="checkbox"/> GP2 <input type="checkbox"/> GP3 <input type="checkbox"/> GP4
Medida do maior diâmetro (mm) pelo exame físico Antes do início da quimioterapia: _____ Imediatamente antes da cirurgia: _____		
Tratamento cirúrgico		
Cirurgia: <input type="checkbox"/> Mastectomia <input type="checkbox"/> Cirurgia Conservadora Data ___/___/___ <input type="checkbox"/> Dissecção axilar linfonodal <input type="checkbox"/> Linfonodo sentinela		
Radioterapia Neoadjuvante: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Data do início: ___/___/___		

Radioterapia adjuvante: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Data do início: __/__/__
Quimioterapia adjuvante: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Data do início: __/__/__ Regime empregado (sigla) _____ nº de ciclos: _____
Hormonioterapia adjuvante: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Data do início: __/__/__ Medicamento: _____ nº de meses: _____
Evolução clínica
1ª Recorrência <input type="checkbox"/> Loco-regional <input type="checkbox"/> Fígado <input type="checkbox"/> Osso <input type="checkbox"/> Pulmão <input type="checkbox"/> SNC <input type="checkbox"/> Pleura <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> Outra Data da recidiva: __/__/__
Metástases (posteriormente) <input type="checkbox"/> Fígado (__/__/__) <input type="checkbox"/> Osso (__/__/__) <input type="checkbox"/> Pulmão (__/__/__) <input type="checkbox"/> SNC (__/__/__) <input type="checkbox"/> Pleura (__/__/__) <input type="checkbox"/> Pleura (__/__/__) <input type="checkbox"/> MO (__/__/__) <input type="checkbox"/> Outra _____ (__/__/__)
Data da última avaliação __/__/__ <input type="checkbox"/> Vivo sem doença (AWD) <input type="checkbox"/> Vivo com câncer (AWC) <input type="checkbox"/> Perdeu seguimento
Óbito __/__/__ <input type="checkbox"/> Secundário ao câncer (DOD) <input type="checkbox"/> Secundário a outras causas (DOC) <input type="checkbox"/> Causa desconhecida
Outras informações que julgar importantes